



TITLE:

# Trichoderma polysporumの生産するペプタイボールTrichosporin-B類の化学的研究( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

飯田, 彰

---

CITATION:

飯田, 彰. Trichoderma polysporumの生産するペプタイボールTrichosporin-B類の化学的研究. 京都大学, 1991, 薬学博士

ISSUE DATE:

1991-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3052999>

RIGHT:

*Trichoderma polysporum* の生産するペプチボール  
Trichosporin- B 類の化学的研究

1991

飯 田 彰

*Trichoderma polysporum* の生産するペプチポール  
Trichosporin- B 類の化学的研究

1991

飯 田 彰

*Trichoderma polysporum* の生産するペプタイボール  
Trichosporin - B 類の化学的研究

目次

理論の部

第1章 緒言	1
第2章 ペプタイボール類に関する従来の研究概要	3
第1節 $\alpha$ -アミノイソ酪酸 (Aib) 含有ペプチド	3
第2節 構造決定に関する従来研究方法	3
第3節 生物物理化学的研究	4
第3章 Trichosporin - B 類の単離と構造	10
第1節 Trichosporin - B 類の単離	10
第2節 Trichosporin - B 類の物理化学的性質	14
第3節 Trichosporin - B 類の構成成分	14
第4節 アミノ酸およびアミノアルコールの絶対配置	19
第5節 Trichosporin - B - V の FAB MS	21
第6節 Trichosporin - B - V の FAB MS/MS	24
第7節 Ile と Leu の相対位置	28
第8節 Trichosporin - B 類の1次構造	28
第4章 Trichosporin - B 類の <sup>1</sup> H-および <sup>13</sup> C-NMR スペクトル	35
第1節 Trichosporin - B - V の <sup>1</sup> H-NMR シグナルの帰属	35
第2節 Trichosporin - B - V の <sup>13</sup> C-NMR シグナルの帰属	41
第3節 Trichosporin - B 類へのHMBCの応用	46
第5章 Trichosporin - B - V の2次構造	49
第1節 Trichosporin - B - V の円二色性(CD) スペクトル	49
第2節 NMR による解析	49

第 6 章 Trichosporin- B- V の合成 .....	61
第 1 節 合成の目的と概略 .....	61
第 2 節 保護 trichosporin- B- V の合成 .....	64
第 3 節 合成 trichosporin- B- V と天然物との比較 .....	68
第 7 章 Trichosporin- B 類の生物活性 .....	72
第 1 節 Trichosporin- B 類のミトコンドリアに対する作用 .....	72
第 2 節 Trichosporin- B 類の副腎髄質細胞に対する作用 .....	74
第 8 章 要約および結語 .....	80
謝辞 .....	81

## 実験の部 .....

第 3 章に関する実験 .....	85
第 4 章に関する実験 .....	87
第 6 章に関する実験 .....	95
第 7 章に関する実験 .....	103
引用文献 .....	104

# 理 論 の 部

## 第1章 緒言

*Trichoderma* 属は、不完全菌綱・不完全糸状菌綱に属し、世界的に広く分布する土壌菌の1種である。現在までに、この属の菌から多くの抗菌性ペプチドリが単離、構造決定されてきた。これらは、いずれもペプタイボールと呼ばれる一連の化合物であり、次の5つの構造的特徴を有している。

1. N-末端がアセチル基で保護されている。
2. C-末端が、アミノ酸の還元されたアミノアルコールで保護されている。
3. アミノ酸残基の約半分は、異常アミノ酸である $\alpha$ -アミノイソ酪酸( $\alpha$ -aminoisobutyric acid、Aib)〔その内の1ないし2残基は異常アミノ酸であるイソバリン(isovaline、Iva)で置換されている場合もある。〕で占められている。
4. 分子量は、2000 ダルトンまでのオリゴペプチドである。
5. 分子中に非常に開裂しやすいAib-Pro (or Hyp)結合を少なくとも1つ含む。

ペプタイボール類には、ラット肝ミトコンドリアに対する酸化的リン酸化の脱共役作用、<sup>2)</sup> 溶血作用<sup>3)</sup>等の生物活性を有するもの、また、脂質2重膜に対して電圧依存性イオンチャンネル形成能<sup>4)</sup>を有するものがある。これらのことから、ペプタイボール類は生物学的だけでなく、物理化学的にも興味ある化合物である。

著者は、シイタケ (*Lentinus edodes*)栽培に、多大な被害をもたらした木材腐朽菌 *Trichoderma polysporum* の培養濾液から、新規ペプタイボールである trichosporin-B 類を単離し、それらの構造を決定した。また、その主成分 trichosporin-B-V を合成し、構造決定の結果が正しいことを証明した。さらに、trichosporin-B 類の高次構造を推定した。また、このペプタイボールがラット肝ミトコンドリアに対して酸化的リン酸化の脱共役作用を示すこと、副腎髄質細胞に対してカテコールアミン分泌作用示すことを明らかにし、その生物活性と構造との関係を考察した。

(注)本論文で使用したアミノ酸の略号は、IUPAC－IUBの生化学命名委員会報告<sup>5)</sup>に従った。

Ala : alanine

Gln : glutamine

Gly : glycine

Ile : isoleucine

Leu : leucine

Phe : phenylalanine

Pro : proline

Ser : serine

Val : valine

そのほかの略号については、随時ことわった上で省略する。



## 第2章 ペプタイボール類に関する従来の研究概要

### 第1節 $\alpha$ -アミノイソ酪酸 (Aib) 含有ペプチド

1967年に、*Trichoderma viride* から alamethicin<sup>1a)</sup>が発見されてから現在までに、多数のペプタイボール類が、主に子囊菌類、およびその不完全世代である不完全菌類から得られている。そのなかでも不完全菌類の *Trichoderma* 属から得られたペプタイボール類は最も多く、alamethicin 類、<sup>6)</sup> trichopolyn 類、<sup>7)</sup> suzukacillin 類、<sup>8)</sup> paracelsin 類、<sup>9)</sup> trichotoxin 類、<sup>9, 10)</sup> trichorzianin 類<sup>11)</sup> が単離されている。それ以外に、*Hypocrea* 属からは hypelcin 類<sup>12)</sup> が、*Emericellopsis* 属からは antiamoebin 類、<sup>13)</sup> emerimicin 類、<sup>14)</sup> zervamicin 類<sup>14b)</sup> が、*Paecilomyces* 属からは leucinostatin A、B<sup>15)</sup> が分離されている。

ペプタイボール類の構造特性として、N-末端をアセチル基で保護されているグループはそのC-末端をアミノアルコールである phenylalaninol (Pheol)、leucinol (Lol)、isoleucinol (Iol)、valinol (Vol)、tryptophanol (Trpol) で保護されている。また同時に、このグループに含まれるペプタイボール類には、Aib以外の異常アミノ酸として Iva あるいはヒドロキプロリン (Hyp) を含む。

一方、N-末端が脂肪酸により保護されているグループは、そのC-末端はジアミノアルコールあるいはジアミンにより保護されている。Aib以外の異常アミノ酸としては、Hyp、 $\beta$ -Ala、ヒドロキシアルキル側鎖をもつアミノ酸がある。

Table 1 に、現在までに報告されたペプタイボール類の構造をまとめて示す。

### 第2節 構造決定に関する従来の研究方法

ペプタイボール類のアミノ酸配列決定に対しては、N-末端が保護されているため通常のペプチドや蛋白質のようにエドマン法は利用できない。また、これらは、いずれも疎水性化合物で水に難溶である。それゆえ、アシラーゼやカルボキシラーゼ等の酵素法<sup>16)</sup>による部分的加水分解はできない。ペプタイボール

類の構造に関する研究は、1967年 Meyerらにより初めて報告された。ペプチドをいろいろな酸性条件下で部分的酸加水分解に付し、得られた分解物に対してエドマン法を適用したり、<sup>16)</sup>あるいは、それを揮発性化合物へ導き、GC MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry) や FD MS (Field Desorption Mass Spectrometry)等で分析するという手法<sup>6a, 8a, 10a, 13, 14a)</sup>が用いられた。1979年 Reinhardtらは、zervamicin 類と emerimicin 類の構造決定に FAB MS<sup>14b)</sup> (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry)を応用し、FAB MSがペプタイボール類の構造決定法の有用な手法であることを示した。<sup>8b, 9)</sup> しかしながら、FAB MSによる構造決定法では、Ile と Leuのような異性体関係にあるアミノ酸残基の位置の決定は不可能であった。最近は、NMRの種々の方法を用いてそれらの問題を解決している報告も認められるようになった。<sup>11a)</sup>

### 第3節 物理化学的研究

ペプタイボール類は、リン脂質2重膜に対して電圧依存性のイオンチャンネルを形成することから、生体興奮性膜における活動電位の性質の多くを人工膜を用いて模倣することができるとされている。また、ペプタイボール類は脱共役作用や溶血作用がある。それゆえ、ペプタイボール類は、生体膜におけるイオン透過性機構を研究するうえでの道具として有用な化合物である。そこで、ペプタイボール類が膜におけるイオン透過性を変化させる機構に関して、主に種々の人工膜を用いて、膜中におけるそのコンフォメーション、配向、凝集等の膜との相互作用が研究されてきた。<sup>17)</sup>

**Table 1.** Primary Structures of Peptaibols from Various Fungi.

Alamethicin ( <i>Trichoderma viride</i> )	
I	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol
II	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
Suzukacillin ( <i>Trichoderma viride</i> )	
	Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
	(Aib) (Leu) (Iva)
Paracelsin ( <i>Trichoderma viride</i> )	
A	Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
B	Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Leu-Alb-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
C	Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
D	Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
Trichotoxin ( <i>Trichoderma viride</i> )	
A-50	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol
	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol

---

	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol
	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol
	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol
	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol
A-40	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Glu-Vol
	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Glu-Vol
	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Glu-Vol

---

Trichorzianine ( *Trichoderma harzianum* )

A-IIa	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Ile-Gln-Gln-Trpol
A-IIla	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Iva-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Ile-Gln-Gln-Trpol
A-IIlb	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Leu-Gln-Gln-Trpol
A-IIlc	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Gln-Trpol
A-IVb	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Iva-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Gln-Trpol
A-Vb	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Ile-Gln-Gln-Pheol
A-VIa	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Iva-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Ile-Gln-Gln-Pheol
A-VIb	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Gln-Pheol
A-VII	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Iva-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Gln-Pheol
B-IIa	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Ile-Gln-Glu-Trpol
B-IIlc	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Glu-Trpol
B-IVb	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Iva-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Glu-Trpol

---

B-Vb	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Ile-Gln-Glu-Pheol
B-Vla	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Iva-Gln-Aib-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Ile-Gln-Glu-Pheol
B-VIb	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Glu-Pheol
B-VII	Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Iva-Gln-Aib-Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Glu-Pheol
Hypelcin ( <i>Hypocrea peltata</i> )	
A-I	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Lol
A-II	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Lol
A-III	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> NO
A-IV	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Lol
B-I	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Lol
B-II	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Lol
B-III	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Lol (+CH <sub>2</sub> )
B-IV	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Lol
B-V	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Iol
C	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Lol

Antiamoebin (*Emericellopsis poonensis*, *E. synnematicola*)

I	Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Aib-Pro-Pheol
II	Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Pro-Gln-Iva-Pro-Aib-Pro-Pheol

---

Emerimicin (*Emericellopsis microspora*)

- III Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Ala-Pheol  
IV Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Aib-Pheol

Zervamicin (*Emericellopsis salmosynnemata*)

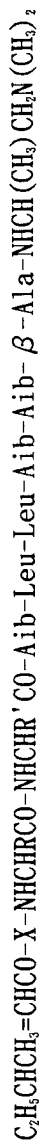
- IA Ac-Trp-Ile-Glu-Iva-Val-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
IB Ac-Trp-Val-Glu-Iva-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
IB' Ac-Trp-Ile-Glu-Aib-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
IC Ac-Trp-Ile-Glu-Iva-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
IIA Ac-Trp-Ile-Gln-Aib-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
IIB Ac-Trp-Ile-Gln-Iva-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
II-1 Ac-Trp-Ile-Gln-Alb-Val-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
II-2 Ac-Trp-Ile-Gln-Aib-Ile-Thr-Aib-Val-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
II-3 Ac-Trp-Val-Gln-Aib-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
II-4 Ac-Trp-Ile-Gln-Iva-Val-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol  
II-5 Ac-Trp-Ile-Gln-Iva-Val-Thr-Aib-Val-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Pheol

∞

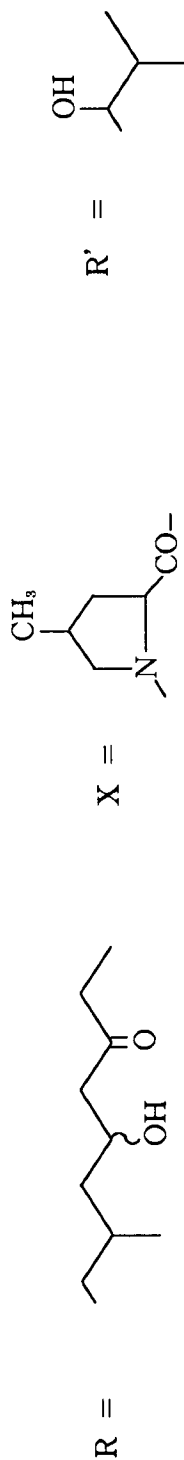
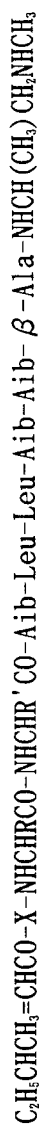
Trichopolyn (*Trichoderma polysporum*)

- I  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO-Pro-NHCHRCO-Ala-Aib-Aib-Ile-Ala-Aib-Aib-NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$   
II  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO-Pro-NHCHRCO-Ala-Aib-Aib-Val-Ala-Aib-Aib-NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
-

p-168 (= Leucinostatin A, *Paecilomyces lilacinus*)



No. 1907- II (= Leucinostatin B, *Paecilomyces lilacinus*)



Aib :  $\alpha$  - aminoisobutyric acid, Iva : isovaline, Iol : isoleucine, Val : valine,

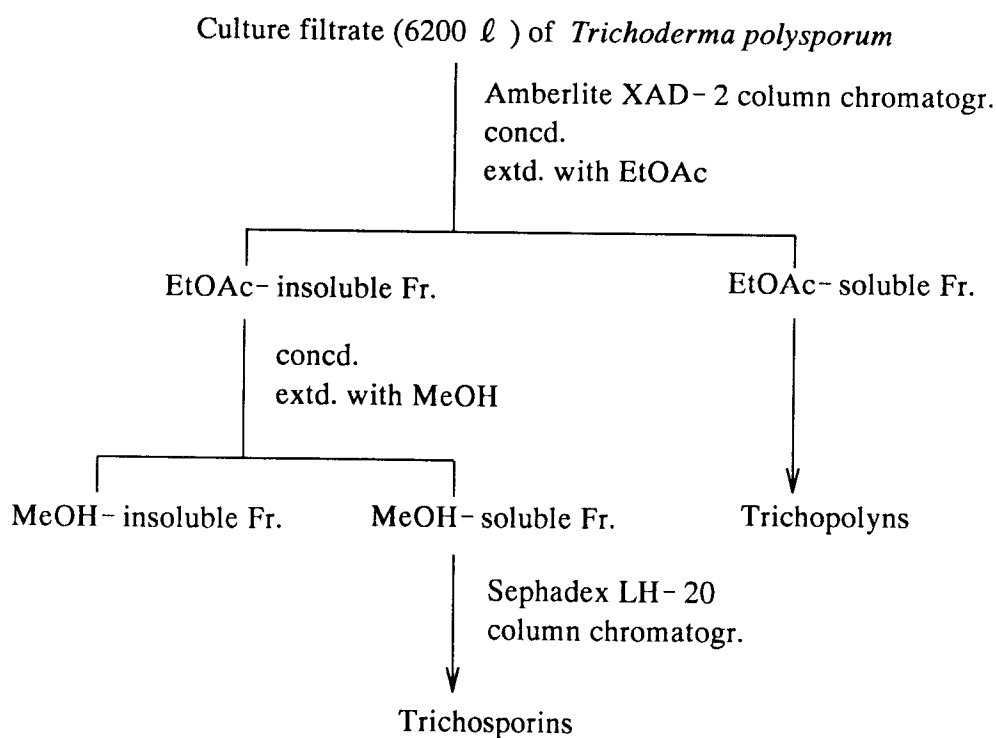
Pheol : phenylalanine, Trp : tryptophan

### 第3章 Trichosporin-B類の単離と構造

#### 第1節 Trichosporin-B類の単離

*Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) Rifai TMI 60146 を Table 2 に示す組成の培地<sup>18)</sup>中、28℃、通気量 200 ℓ / min、回転数 67rpm で4日間培養後、培養液を菌体と培養濾液に分け、培養濾液 (6200 ℓ ) を Amberlite XAD-2 (20 Kg) に吸着、MeOH (20 ℓ )、Acetone (10 ℓ ) で溶出した。溶出液を濃縮後、水を加え、EtOAc で抽出し、水層の濃縮残渣の MeOH 可溶部を Sephadex LH-20 に付し、trichosporin 画分としてシロップ状残渣を得た (Fig. 1)。

その trichosporin 画分 を MeOH に溶かし、ODS カラムを用いた逆相 HPLC



**Figure 1.** Isolation Procedure for Trichosporin-Bs.



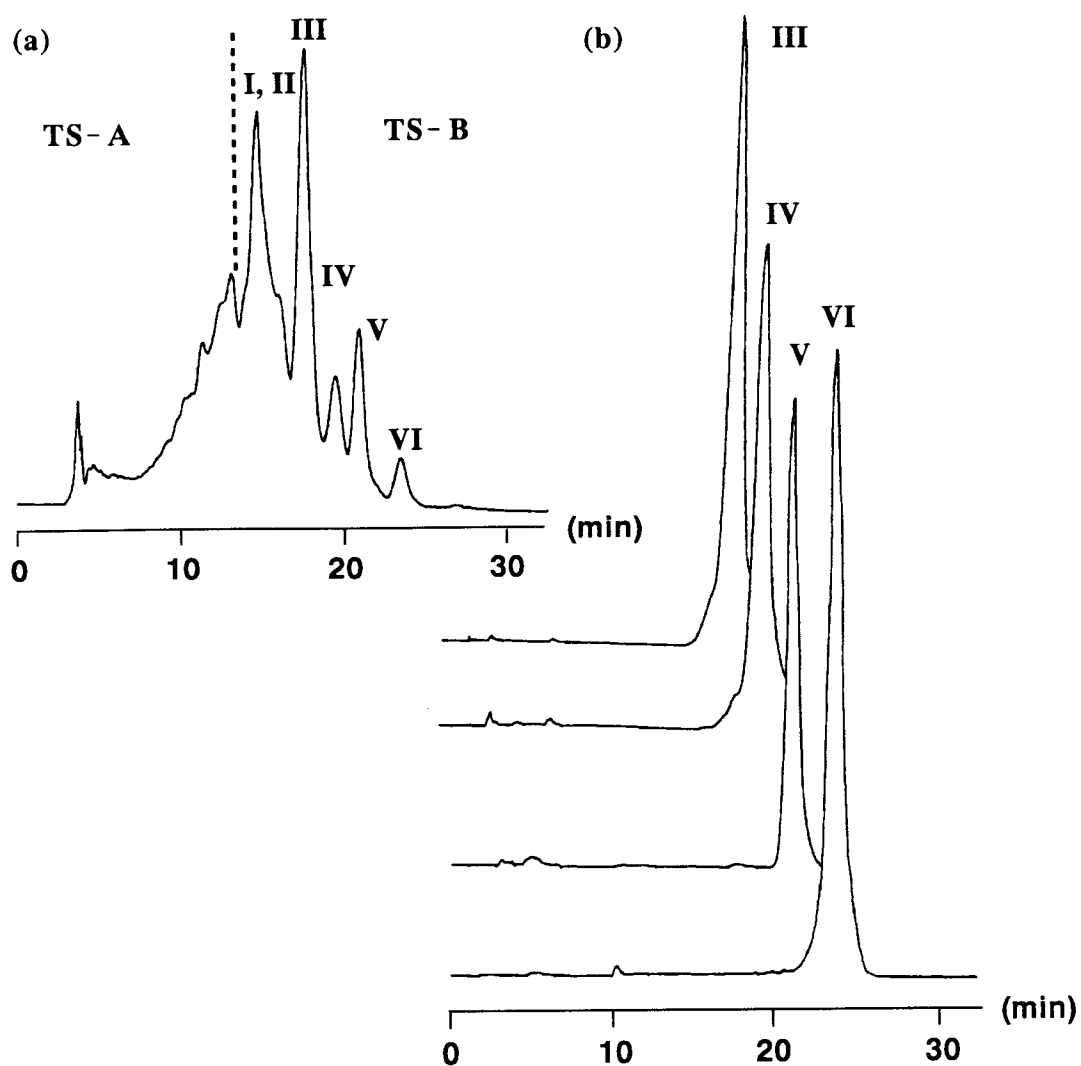
(High Performance Liquid Chromatography)分析に付したところ多数のピークを示した。便宜上、ピークの前半をA群、後半をB群とし、分離の容易なB群を溶出順に、trichosporin-B-I~VI(以下、trichosporinはTSと略す)とした(Fig. 2(a))。また、TS画分を分取HPLC(ODS)に付し、単一ピークを示すTS-B-III~VI(Fig. 2(b))を得たが、そのNMRスペクトルおよびアミノ酸分析から、Vを除

**Table 2.**

グルコース	1.75 Kg	MgSO <sub>4</sub> ・H <sub>2</sub> O	700 g
酒石酸アンモニウム	2.8 Kg	FeCl <sub>3</sub>	70 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4 Kg	H <sub>2</sub> O	700 ℓ

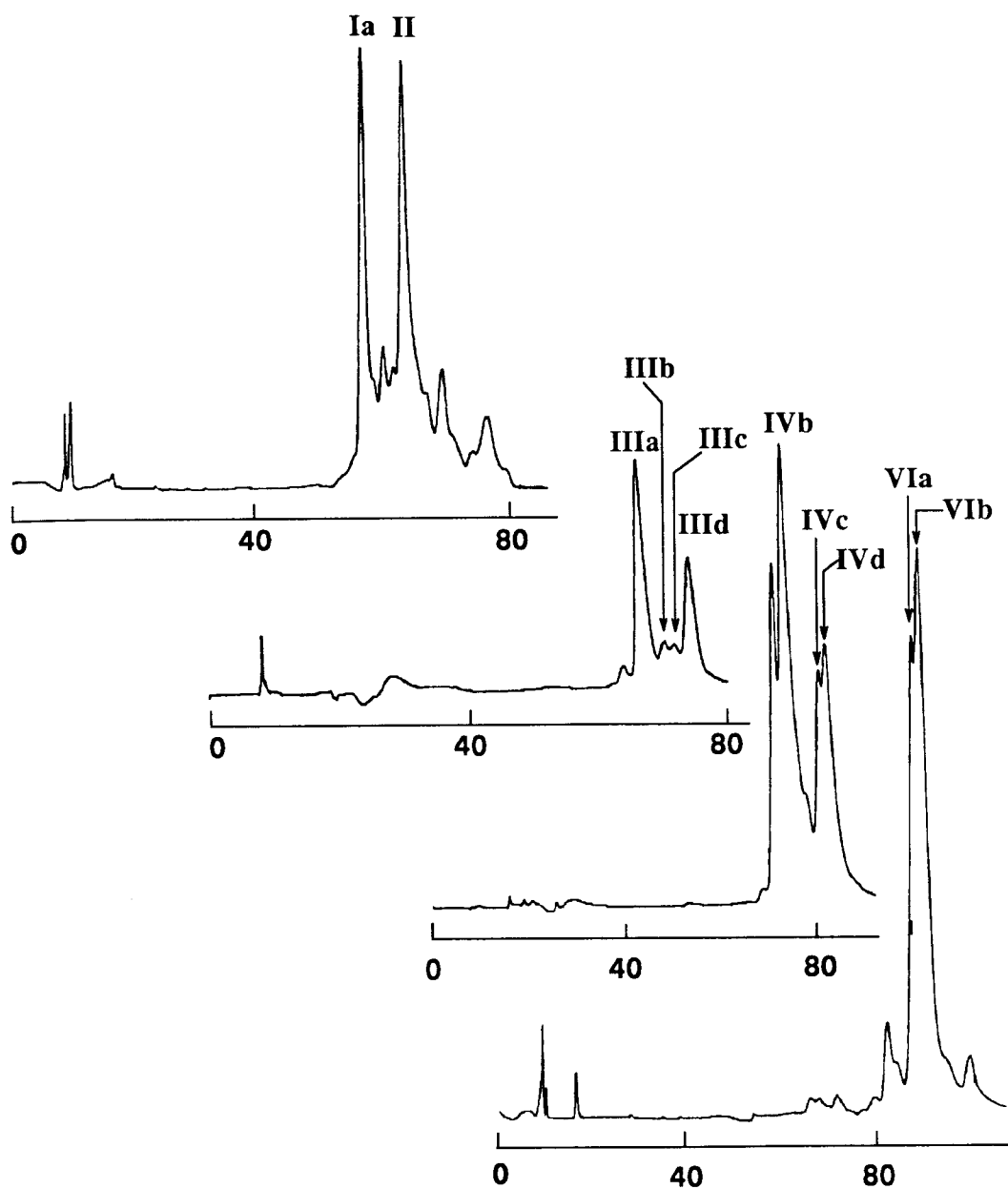
HClでpH 3.5に調整

きいずれも単一化合物ではなかった。得られたTS-B-III、IVおよびVIを逆相フェニルカラムを用いて分析したところ、IIIとIVは4成分、VIは2成分の混合物であることが分かり、それぞれ、溶出順にIIIa~IIId、IVa~IVd、VIa~VIbとした(Fig. 3)。ODSカラムで分離できなかったIとIIを含むフラクションは、このカラムでの分析で多数の成分の混合物であることが分かり、分取可能な主成分をIaとした。そこで、このカラムを用いて分取を繰り返すことにより、ODSカラムで先に分取したVとともに純粋な11種類のTS-B-Ia、IIIa~IIId、IVb~IVd、V、VIaおよびVIbを単離することができた。。



**Figure 2.** Analytical HPLC Chromatograms of Trichosporin-Bs.

Conditions : mobile phase, CH<sub>3</sub>OH / H<sub>2</sub>O (85 : 15)  
 flow rate, 0.5 ml / min  
 aufs, 0.08  
 column, Nacalai Cosmosil 5 C<sub>18</sub> (4.6 mm i. d × 150 mm)  
 detector, UV (220 nm)  
 column temperature, 40 °C



**Figure 3.** Analytical HPLC Chromatograms of Trichosporin- Bs.

Conditions : mobile phase,  $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$  (85 : 15)

flow rate, 0.6 ml / min

aufs, 0.08

column, Nacalai Cosmosil 5 Ph (8 mm i. d  $\times$  250 mm)

detector, UV (220 nm)

column temperature, 40 °C

## 第2節 Trichosporin-B類の一般的物理・化学的性質

TS-B類は、IR スペクトル (KBr 法) で、 $3300\text{ cm}^{-1}$  (NH 伸縮)、 $1660\text{ cm}^{-1}$  (CO 伸縮) ならびに  $1530\text{ cm}^{-1}$  (NH 変角) に吸収を示した。また、 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルで、それぞれ NH ( $\delta_{\text{H}}$ : 6–9) と CO ( $\delta_{\text{C}}$ : 170–180) のシグナルを示したことから、TS-B類は、ペプチド性化合物であることが分かった。しかしながら、TS-B類は、ニンヒドリン試薬に対し陰性を示し、HBr–ニンヒドリン試薬に陽性を示した。さらに、これらはジアゾメタンでメチル化されなかった。それゆえ、TS-B類は、N-末端、C末端残基ともに保護されており、側鎖に遊離のアミノ基もカルボキシル基も持たないペプチドであることが推定された。また、TS-B類の MeOH 中で測定された CD (Circular Dichroism、円二色性) スペクトルにはいずれも、207 と 221 nm に負の Cotton 効果による吸収が認められた。それゆえ、TS-B類は、この溶媒中で helix 構造をとることが示された。<sup>19)</sup>

Table 3 に、TS-B類の融点、分子楕円率ならびに旋光度  $[\alpha]_{\text{D}}$  を示す。

## 第3節 Trichosporin-B類の構成成分

TS-B類の全構成成分 (Table 4) は、アミノ酸分析に加え NMR、FAB MS ならびに FAB MS/MS を用いることにより知ることができた。その結果、TS-B類には、アセチル基が存在すること、また、自動アミノ酸分析計の通常のプログラムでは定量あるいは検出できない異常アミノ酸である Aib と Iva、ならびにアミノアルコールである Pheol が含まれることが明らかになった。

アセチル基は、TS-B類の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (Fig. 4 (c)) にアセチルシグナル ( $\delta_{\text{H}}$ : 約 2 ppm) が認められたことからその存在が確認された。

また、TS-B類の FAB MS、FAB MS/MS スペクトルは、TS-B類に 85 a. m. u. と 99 a. m. u. の質量数をもつ残基が含まれることを示し、それらが Aib と Iva であることを示唆した (Fig. 4 (d))。それらの存在は、TS-B類の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルの NH 領域にシングレットのシグナルが認められたこと、さらに  $^{13}\text{C}$ -

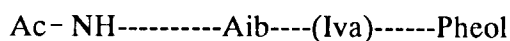
NMR、DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) スペクトルの  $\alpha$ -炭素領域に、4級  $\alpha$ -炭素のシグナル (Aib:  $\delta_c$ , 57 ~ 59; Iva:  $\delta_c$ , 60 ~ 61) が認められたことから、それらの残基数とともに確認された (Fig. 4 (b), (c))。

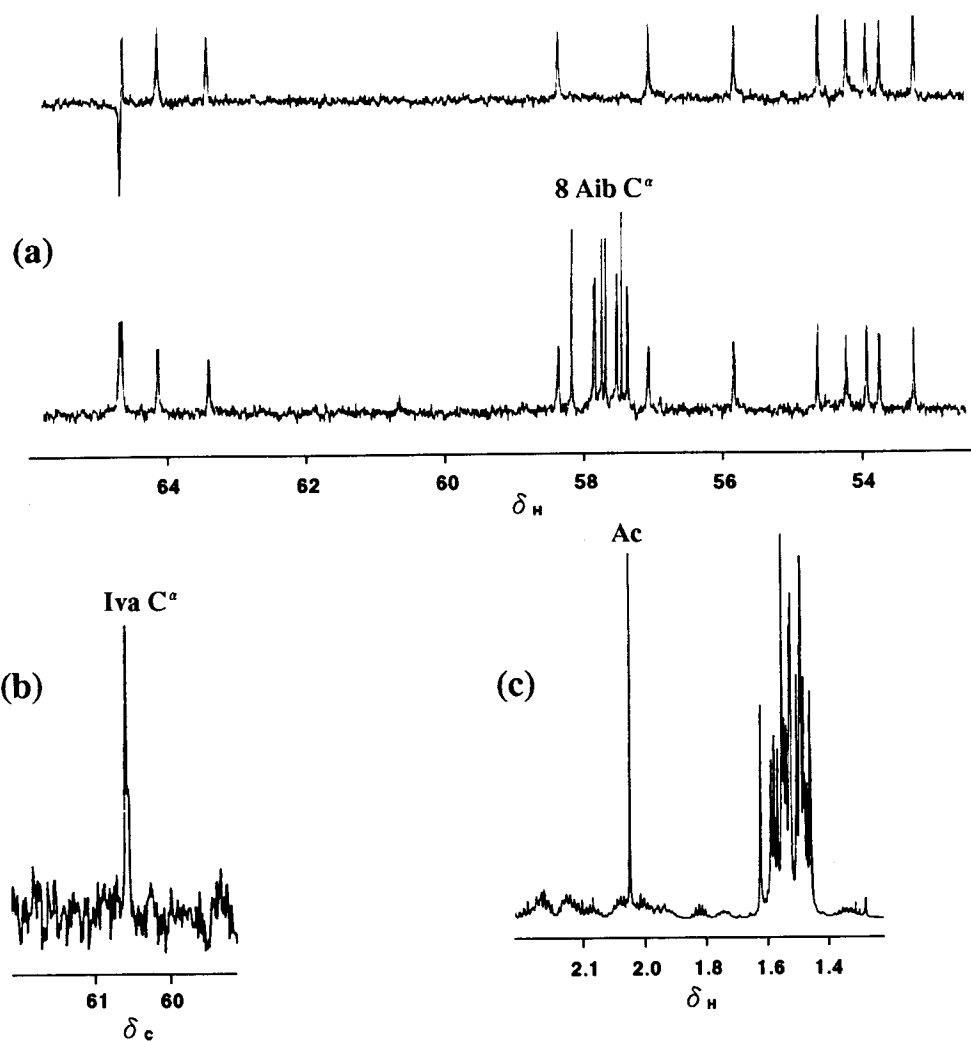
Table 3. Characteristics of Trichosporin- Bs.

Trichosporin	M. p. (°C)	Molecular ellipticity [ $\theta$ ] (° cm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup> ) ( $\times 10^3$ )		[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> (MeOH)
		207 nm	221 nm	
B- Ia	224 – 226	–	–	– 24.8° (c 0.42)
B- IIIa	256 – 258	–	–	– 20.4° (c 0.52)
B- IIIb	232 – 235	– 3377	– 2271	–
B- IIIc	249 – 252	– 3296	– 2256	–
B- IIIId	261 – 264	–	–	– 22.4° (c 0.34)
B- IVb	191 – 194	– 3180	– 2247	–
B- IVc	246 – 250	– 3057	– 2176	–
B- IVd	244 – 247	– 3726	– 2795	–
B- V	268 – 271	– 3508	– 2657	– 16.3° (c 0.67)
B- VIa	239 – 242	– 3080	– 2260	–
B- VIb	250 – 254	– 3205	– 2390	–

さらに、TS-B類の FAB MS と FAB MS/MS スペクトルは、それらの C-末端に 150 a. m. u. の質量数をもつ残基が存在すること示し、それが Pheolであることを示唆した。その存在は COSY<sup>20)</sup> (Correlated Spectroscopy) スペクトルに、Pheol由来のスピンスystemが明瞭に認められたことから確認された (Fig. 4 (e))。

これらの事実から、TS-B類の基本構造は、次に示すような N-末端をアセチル基で、C-末端を Pheol で保護された、異常アミノ酸、Aib および Iva を含むペプチドであることが明らかになった。





**Figure 4.** NMR Spectra of Trichosporin-Bs.

- (a) Part of a 100 MHz DEPT spectrum of trichosporin-B-V.
- (b) Part of a 100 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of trichosporin-B-IVd.
- (c) Part of a 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of trichosporin-B-V.
- (d) FAB mass spectrum of trichosporin-B-V.
- (e) 600 MHz COSY spectrum of trichosporin-B-V in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ .



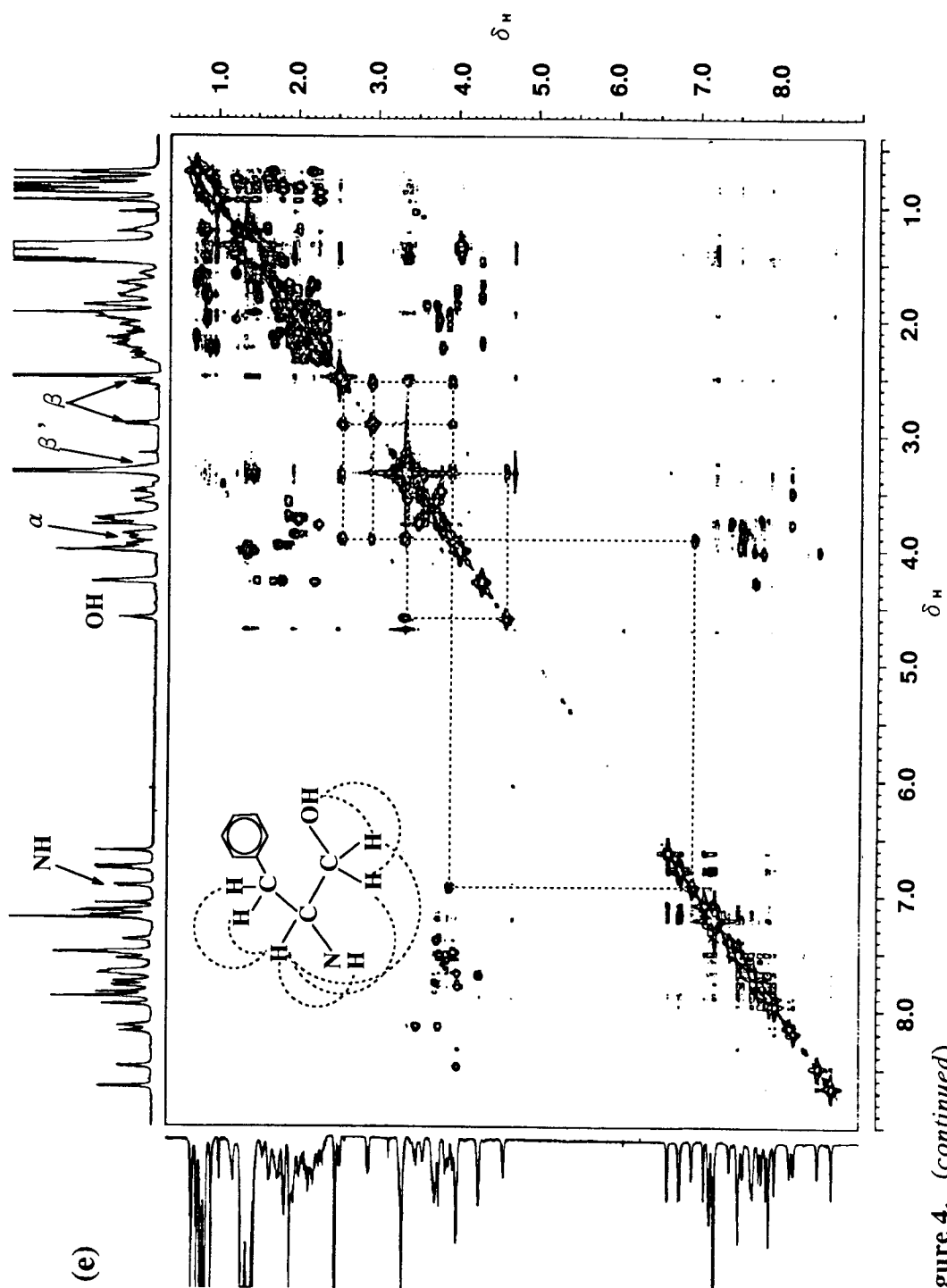


Figure 4. (continued)



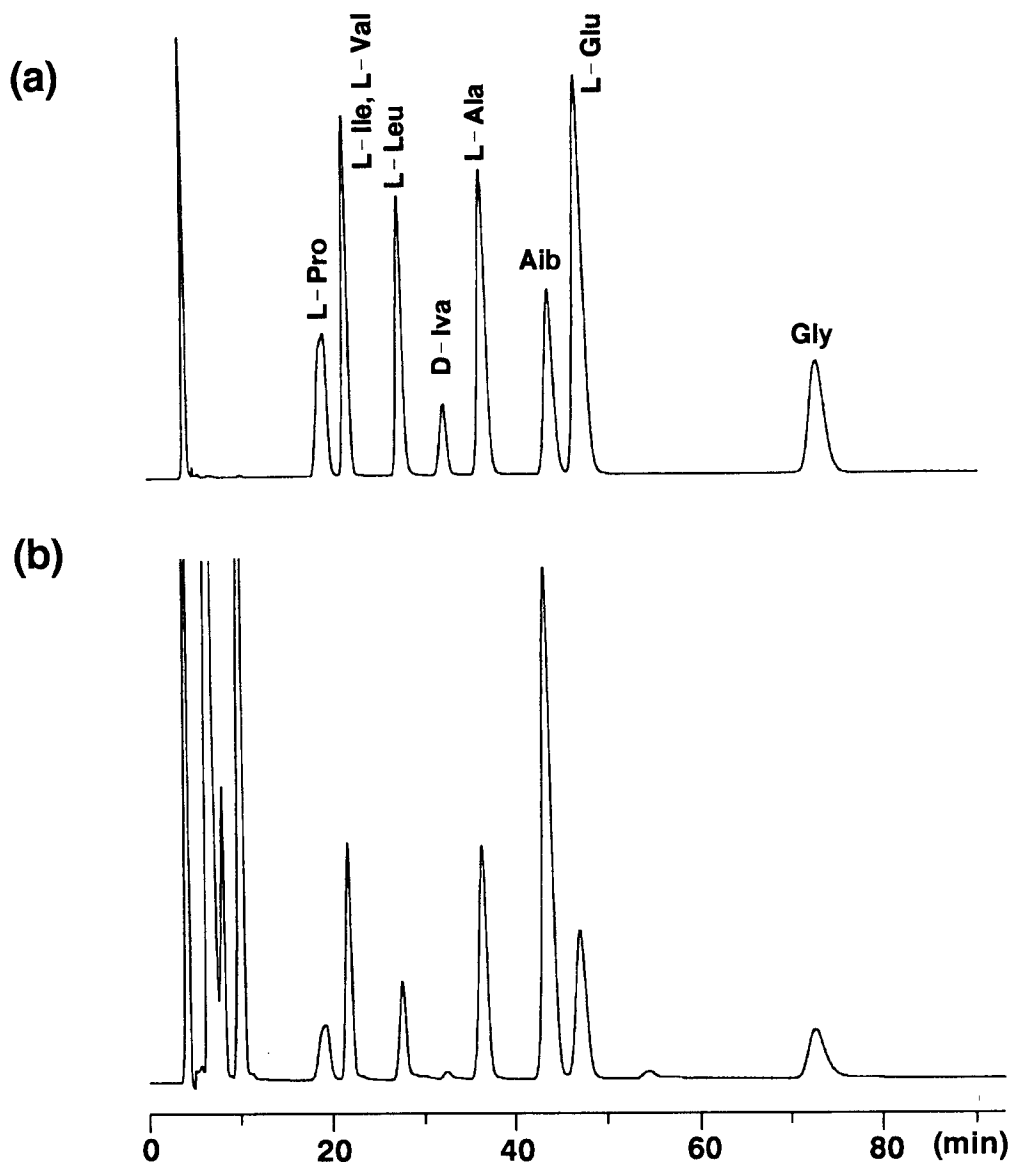
**Table 4.** Amino Acid Proportions of Trichosporin- Bs.

Trichosporin- B	Ia	IIIa	IIIb	IIIc	IIId	IVb	IVc	IVd	V	VIa	VIb
Ser	1										
Glu	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Gly	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ala	2	3	4	4	3	3	2	3	3	2	3
Aib	8	8	7	7	8	7	9	7	8	9	7
Val	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1
Iva						1		1			1
Ile			1	1					1	1	1
Leu	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Pro	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ac	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pheol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

#### 第4節 アミノ酸およびアミノアルコールの絶対配置

TS-B類の光学活性構成アミノ酸おとび Pheolの絶対配置は、光学活性なカラムを用いて HPLCで分析することにより決定した。HPLCに供する分析サンプルは、ペプチドの酸加水分解物を、アミノ酸は、N- 2, 4- dinitrobenzoyl methyl esterに、Pheolは N, O- bis- 2, 4- dinitrobenzoateに誘導したものをを用いた。その結果、光学活性アミノ酸のうち Ivaのみ D-体であり、あとはすべて L-体であった。ま

た、Pheolも L-体であった。Fig. 5に TS-B-V についての HPLC クロマトグラムを示す (Pheol 誘導体は、保持時間が長いので、このクロマトグラムには、そのピークは観察されていない)。



**Figure 5.** Determination of the Absolute Configuration of the Constituent Amino Acids of Trichosporin- B- V by HPLC.

(a) Standard amino acid derivatives.

(b) Amino acids derived from the acid hydrolysate.

## 第5節 Trichosporin- B- V の FAB MS

既に述べたように、TS- B類はそのN-末端、C-末端ともにそれぞれアセチル基およびPheolで保護されているために、そのアミノ酸配列の決定にはFABMS法を用いた。

Fig. 6にTS- B- VのFAB massスペクトルの分子イオン領域を示す。NaI、KIの添加で、 $m/z$  1973、1989のイオン量が増大したので、これらのイオンはそれぞれ $(M+Na)^+$ 、 $(M+K)^+$ イオンに同定された。それゆえ、 $m/z$  1951がTS- B- Vの $(M+H)^+$ イオンと決定された。同位体効果を考慮した各イオンの nominal mass (C = 12, H = 1, N = 14, O = 16として計算された質量数)は、それぞれ1950、1973、1988となるので、TS- B- Vの分子量は nominal massで1949と決定された。この値は、 $^{13}\text{C}$ -NMRでTS- B- Vの炭素が91個存在すること(第4章第2節)、アミノ酸分析の結果、ならびにアセチル基とPheolが各1個存在すること

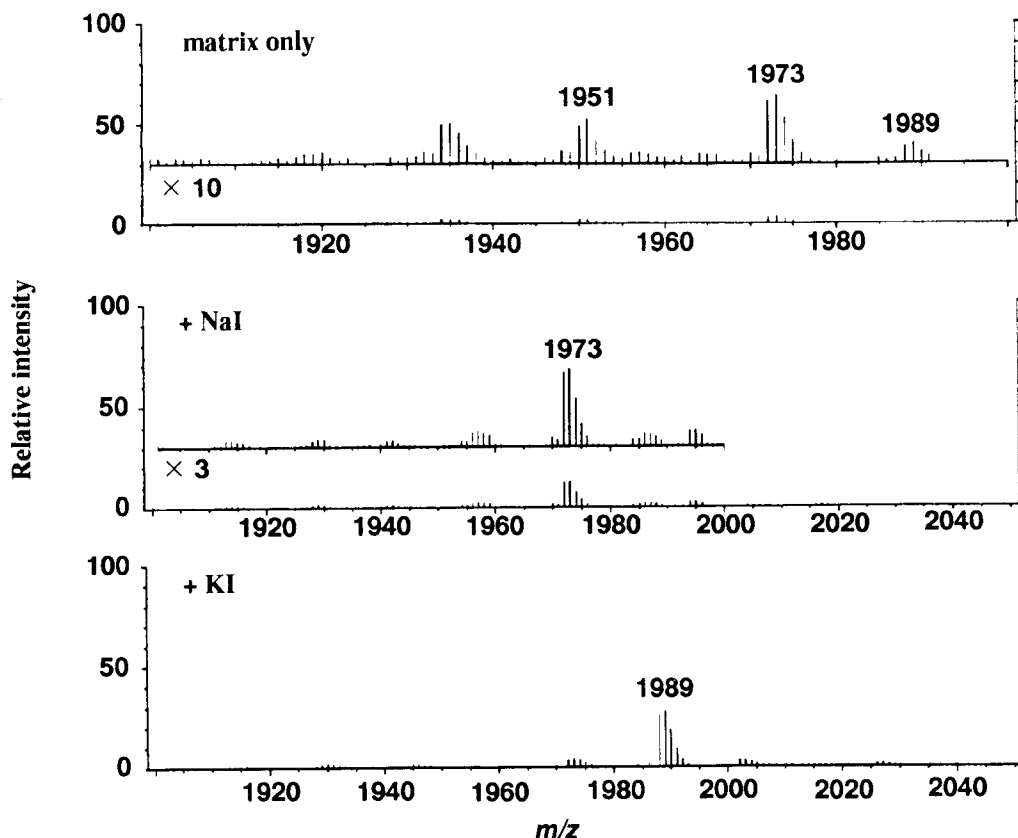


Figure 6. Molecular Ion Regions of FAB Mass Spectra of Trichosporin- B- V.

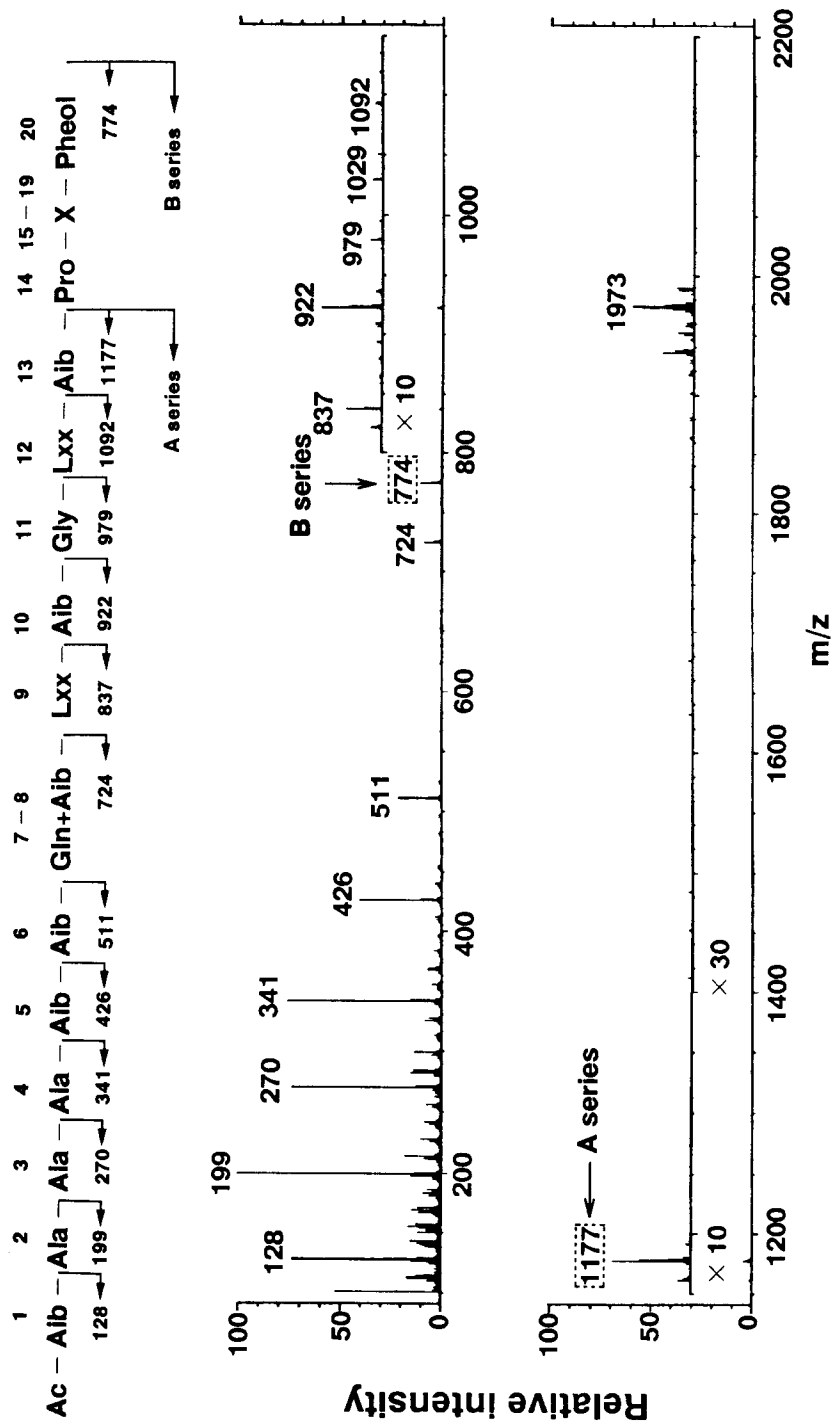
を考慮し計算された TS-B-V の分子式  $C_{91}H_{151}N_{23}O_{24}$  (1949) の nominal mass に一致する。

TS-B-V の FAB mass スペクトル (Fig. 7) には、 $m/z$  1200 以上に顕著なフラグメントイオンが認められない。しかしながら、スペクトルには  $m/z$  1177 イオンで始まる acylium ion series に由来しないもう 1 つの顕著なフラグメントイオンが  $m/z$  774 に認められる。 $m/z$  1177 と  $m/z$  774 をたすと 1951 となり、TS-B-V の分子量 (1949) にほぼ一致する。この分子に Pro 残基が存在することを考慮すると、 $m/z$  1200 以上に顕著なフラグメントイオンが認められない理由が、このペプチド分子に不安定な Aib-Pro ペプチド結合<sup>21)</sup>が存在し、原子衝撃の際にこの結合が優先して開裂したためであると結論できる。それゆえ、以上の結果と本章第 3 節で述べた基本構造から、TS-B-V がペプタイボールであることが明らかになった。

そのアミノ酸配列は、上記考察から  $m/z$  1177 と  $m/z$  774 とで始まる 2 つの acylium ion series A と B から求められる 2 つのオリゴペプチドのアミノ酸配列を Aib と Pro で結びつけることにより決定される。Fig. 7 に示すように  $m/z$  1177 で始まる A series は、Aib、Leu (Ile)、Gly、Aib、Ile (Leu)、(Gln+Aib)、2Aib、3Ala を順次失い Ac-Aib ( $m/z$  128) を与えるフラグメントイオンを有していたので、N-末端オリゴペプチドに由来していることが明らかになった。それゆえ、 $m/z$  774 とで始まる B-series は C-末端オリゴペプチドに由来することが分かった。しかしながら、B-series にはそのアミノ酸配列を決定するための顕著なフラグメントイオンは明瞭に観察されなかった。また、7-8 位のアミノ酸配列を決定するための顕著なフラグメントイオンも観察されなかった。それゆえ、アミノ酸組成を考慮すると、FAB MS から得られる TS-B-V のアミノ酸配列は、Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-(Gln+Aib)-Ile (or Leu)-Aib-Gly-Leu (or Ile)-Aib-Pro-(2 Aib + 2 Gln + Val)-Pheol と決定された。

Fig. 8 に FAB MS による TS-B-V のフラグメンテーションの様式をまとめた。

- ① TS-B-V の分子に Aib-Pro 結合が 1 つ存在し、その Pro の N 原子に  $H^+$  が優先的に付加する。
- ② FAB による衝撃で、その不安定な結合が開裂し、 $m/z$  1177 イオンが生成する。

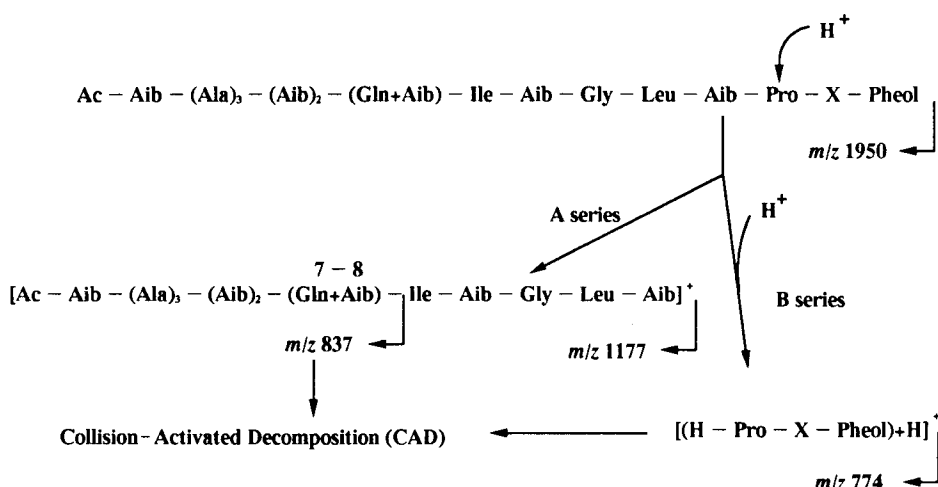


**Figure 7.** Positive-ion FAB Mass Spectrum of Trichosporin - B-V.

Lxx and X stand for Ile or Leu, and 2 Aib + 2 Gln + Val, respectively.

③それとともに、その開裂により生じた中性のC-末端オリゴペプチドにH<sup>+</sup>が1つ付加することにより  $m/z$  774 イオンが生成する。

このような開裂様式は、Aib-Pro結合を有するペプチドの特徴であり、未知ペプチドサンプルの FAB MS 測定において、ペプチドであるか否かの指標となった。



**Figure 8.** Proposed Fragmentation for Two Acylium Ion Series in the FAB Mass Spectrum of Trichosporin-B-V.

## 第6節 Trichosporin-B-V の FAB MS/MS

FAB MSで決定されなかった部分のアミノ酸配列に関しては、Fig. 8に示した2つのフラグメントイオン ( $m/z$  837、774) について、FAB MS/MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry / Mass Spectrometry)を行った。本節で述べる FAB MS/MS 実験の装置は、4重極型の質量分析計を3つ直列した Triple Stage Quadrupole mass spectrometer<sup>22)</sup> (TSQ)を用いた。生成イオンの活性化は CAD<sup>23)</sup> (Collision-Activated Decomposition)により行った。CADは、イオン化により生成されたイオンに、エネルギーをもった中性粒子 (Ar, Xe)を衝突させ、イオンを活性化することによって、それから解離イオンを得る手法である。

### 3-6-1 7-8位のアミノ酸配列

Fig. 9に示されるように、 $m/z$  837のイオンをCADにより中性原子 ArあるいはXeを衝突、活性化させると、 $m/z$  724から85 a. m. u. (Aib)少ない $m/z$  639のイオンが生成された。それゆえ、7-8位のアミノ酸配列は、Gln-Aibと決定された。FAB MSにおいて、 $m/z$  639のイオン強度が弱いのは、Gln acylium ion ( $m/z$  639)が非常に不安定で、その存在時間が短いためであると考えられる。あるいは逆に、Aib acylium ion ( $m/z$  724)が非常に安定なために、Gln acylium ionが生成されにくいと考えられる。

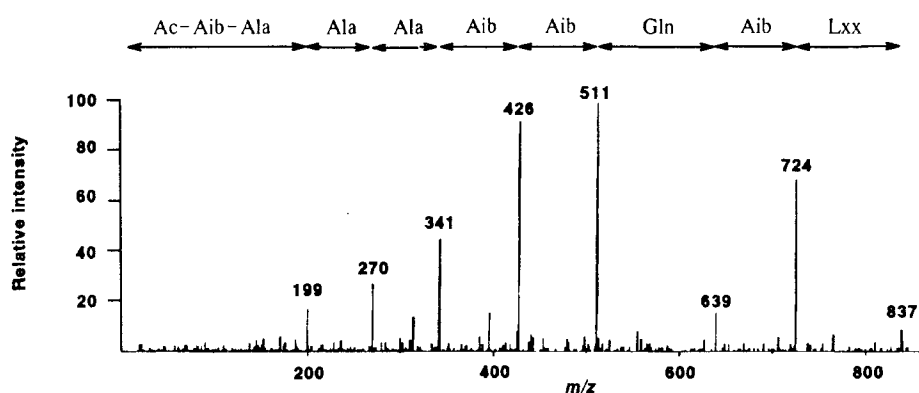
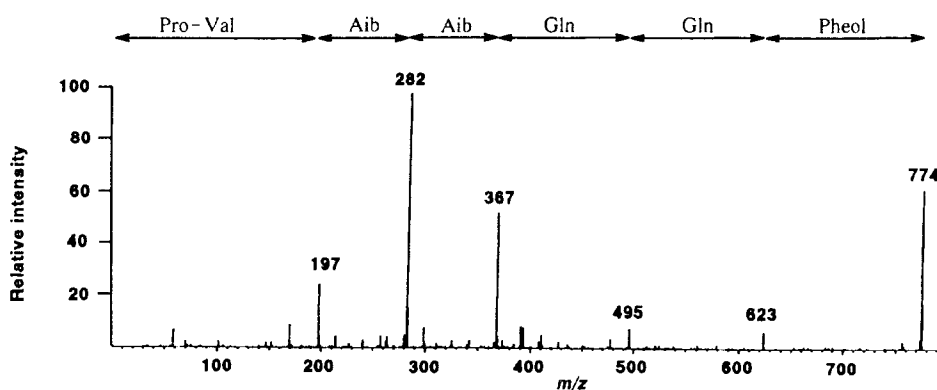


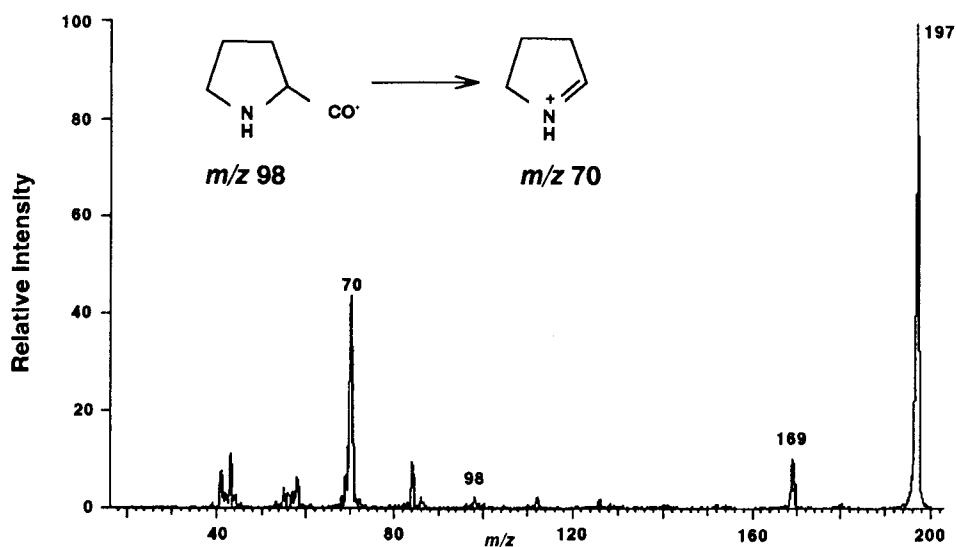
Figure 9. CAD Spectrum of  $m/z$  837 ion.

### 3-6-2 C-末端オリゴペプチドアミノ酸配列

上記と同様にしてC-末端由来の $m/z$  774イオンからは、 $m/z$  623、495、367、282、197の各イオンが生成された (Fig. 10)。それらのイオンを帰属すると、C-末端オリゴペプチドアミノ酸配列は、(Pro + Val)-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheolとなる。次に、ProがそのN-末に位置することを確認するために、 $m/z$  197のイオンについてCADを行ったところ、Pro acylium ion ( $m/z$  98)は観察されなかったが、それからCOの解離したA-タイプのイオン ( $m/z$  70)が認められた (Fig. 11)。さらに、合成によって得た dipeptideである H-Pro-Val-OHと H-Val-Pro-OHの親イオン $m/z$  215のCADスペクトルを比較すると、前者が、 $m/z$  70のイオンを生成することが分かった (Fig. 12)。これらの結果から、Pro残基がC-末端オリゴペプチドのN-末端に位置することが明確に確認された。著者の知る



**Figure 10.** CAD Spectrum of  $m/z$  774 Ion Originating from the C-terminal Oligopeptide.

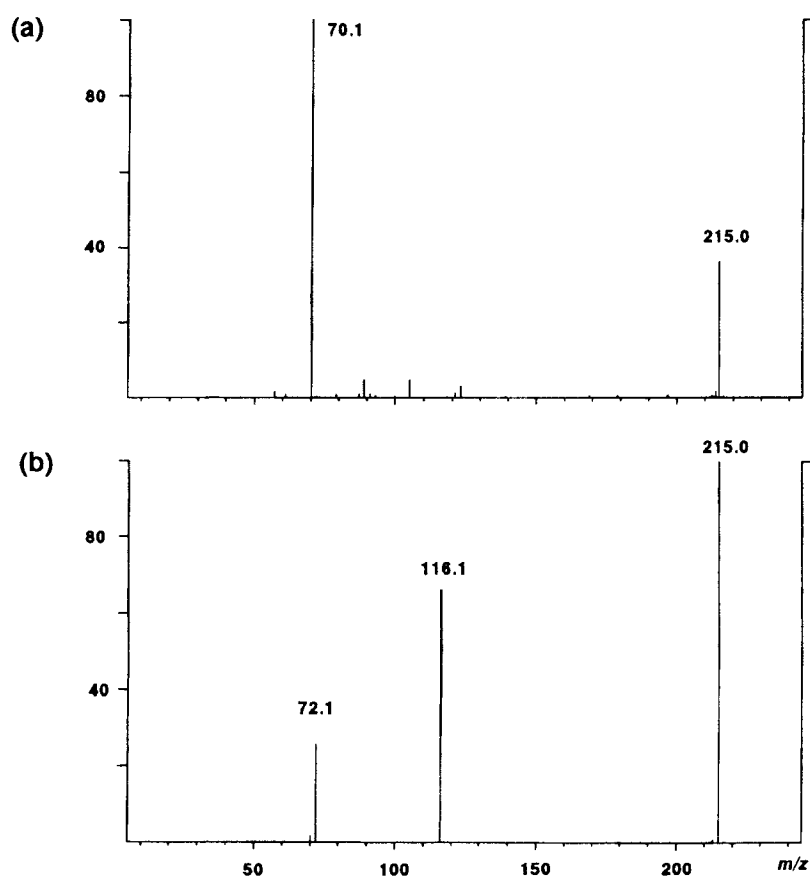
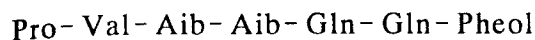
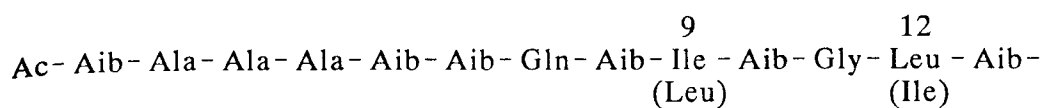


**Figure 11.** CAD Spectrum of  $m/z$  197 Ion.

かぎり、質量分析でペプタイボールのProの位置をこのように明らかにした例は、これが初めてである。

それゆえ、TS-B-Vの全アミノ酸配列は、N-末端オリゴペプチドのC-末端Aibと、このC-末端オリゴペプチドのProを結び付けることにより、次のように求められる。





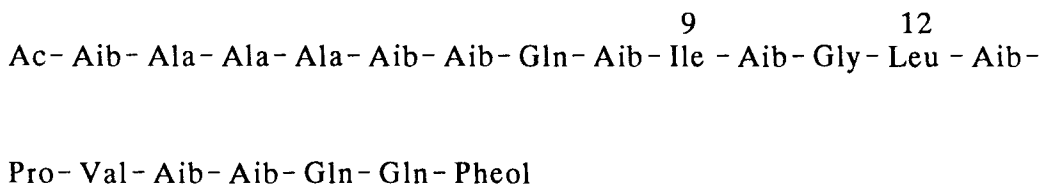
**Figure 12.** CAD spectra of  $m/z$  215 ions arising from H-Pro-Val-OH (a) and H-Val-Pro-OH (b).

残る問題は、9位、12位に位置する異性体関係にある Ile と Leu の区別である。通常、4 sector 方式の磁場型装置<sup>24)</sup>による FAB MS/MS では、それらを区別することは原理的に可能であるが、4 重極型の質量分析計では不可能である。そこで、著者は、これらアミノ酸の位置決定に NMR を用いて行った。

### 第7節 Ile と Leu の相対位置

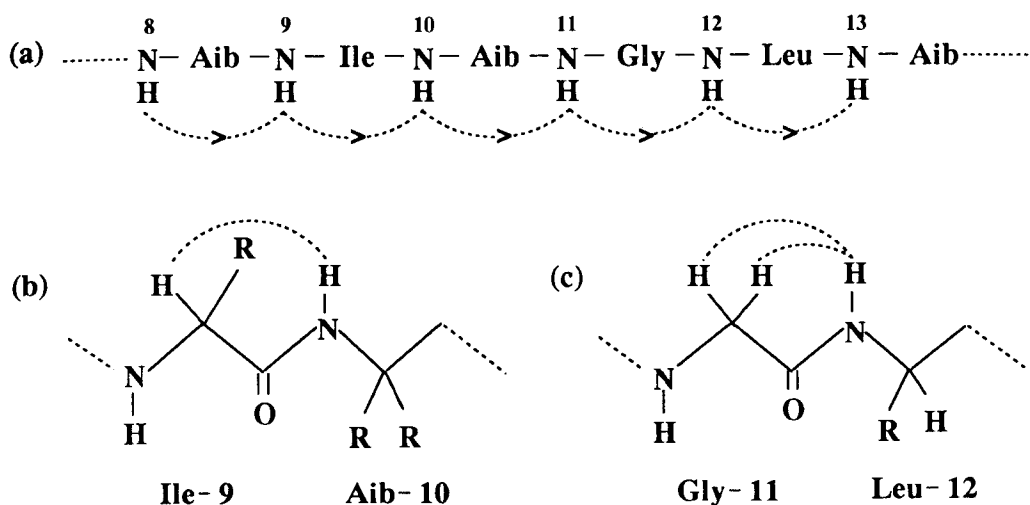
Ile と Leu の位置を NMR で決定するには、1 次元 NMR による手法では、例えば、差 NOE (nuclear Overhauser effect) 法や LSPD <sup>25)</sup> (long-range selective proton decoupling) 法を、また、2 次元 NMR による手法では、NOESY <sup>26)</sup> (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) や HMBC <sup>27)</sup> (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity) 等の方法を利用することが考えられる。しかしながら、TS-B-V の場合、1 次元 NMR による手法では、明確な結果は得られなかったので、NOESY を用いて Ile と Leu の位置を決定した。なお、NOESY スペクトルについては、第 4 章で詳述するので、この章では、それより得られた結果のみ示す。

Fig. 13は、NOESYスペクトルの詳細な解析から得られた、Ileあるいは、Leu残基と近接する残基間で観察されたNOEを模式的に表わしている。IleのNHはAib<sup>8</sup>とAib<sup>10</sup>のNHとの間に、LeuのNHはGly<sup>11</sup>とAib<sup>13</sup>のNHとの間にそれぞれNH-NH cross peakを示した (Fig. 13 (a))。また、Ileの $\alpha$ -プロトンはAib<sup>10</sup>のNHと (Fig. 13 (b))、Glyの $\alpha$ -プロトンはLeuのNHとC $\alpha$  H-NHクロスピークを示した (Fig. 13 (c))。これらの結果から、IleとLeuはそれぞれ9位と12位に位置することが分かった。それゆえTS-B-Vの全アミノ酸配列は、下式のように決定された。



## 第8節 Trichosporin-B類の構造

他の 10 種類の TS-B 類の構造も同様に、FAB MS、FAB MS/MS、NMR および構造の比較から決定された。その FAB mass スペクトルは、TS-B-V のそれと、同様のフラグメントパターンを示し、共通するイオンも多く認められたことか



**Figure 13.** Diagnostic NOEs for Sequencing Ile and Leu.

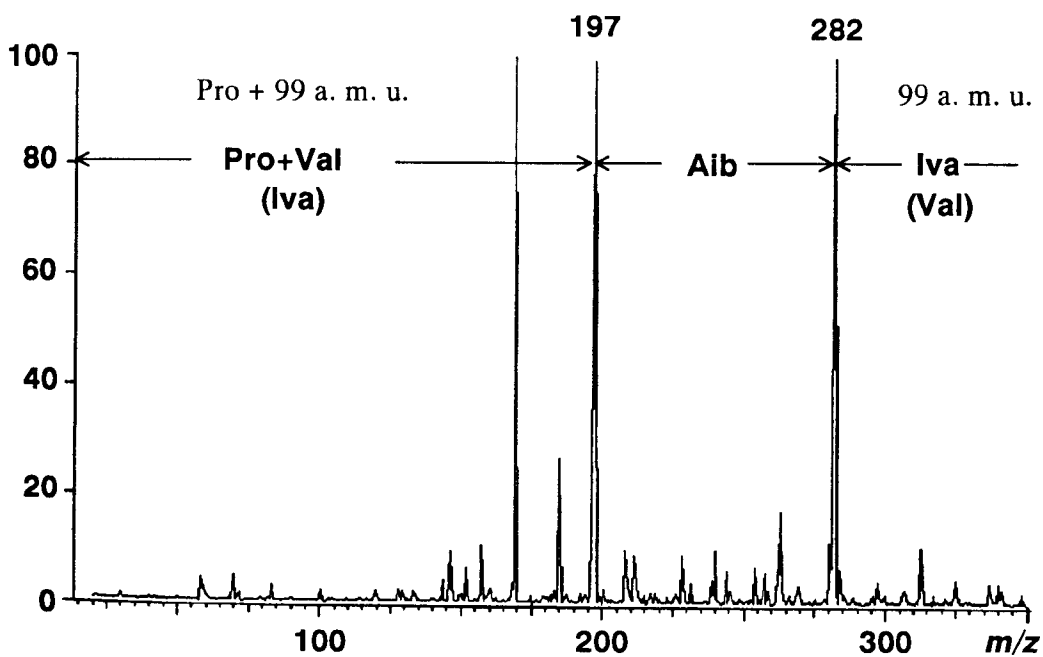
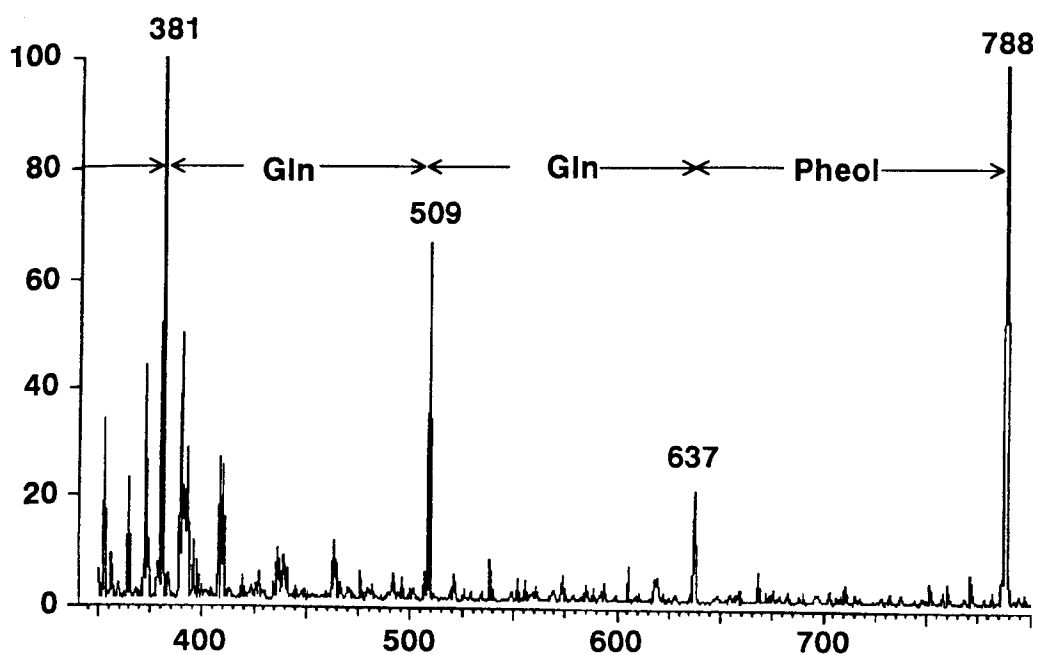
ら、それらの1次構造は、TS-B-Vと非常に類似していることが示唆された。TS-B-Vの場合と同様に、フラグメントイオンが不明瞭な箇所ではCADを行った。観察されたフラグメントイオンをTable 5に示す。異性体関係にあるIleとLeuあるいはIvaとValの両者をもとに含まないTS-B類はIa、IIIa、IIIcおよびIVcである。これらの全構造は、それぞれのフラグメントイオンから容易に決定された(Table 6)。また、異性体残基の対を含まないIVbとIVdのN-末端オリゴペプチドおよびIIIb、IIIcとVIaのC-末端オリゴペプチドの構造も同様にして決定された。Ia、IIIa、IIIc、IVb、IVcおよびIVdのN-末端オリゴペプチドの9位は、それぞれLeu、Leu、Val、Leu、Val、Valであり、12位は共通してLeuであった。一方、Ivaを含まないC-末端オリゴペプチドの15位はすべて共通してValであり、17位はAibあるいはAlaであった。

TS-B-IVb、IVdならびにVIbのC-末端オリゴペプチドに由来するイオンのCADスペクトルは、この部分に99 a. m. u.のイオンが2か所にあることを示した(Fig. 14)。それゆえ、これらの位置にIvaとVal残基が存在することになる。TS-B-IVbに関しては、それらの位置はCOLOC<sup>28)</sup>(<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-Correlated Spectroscopy via Long Range Coupling)スペクトルを解析することにより確認さ

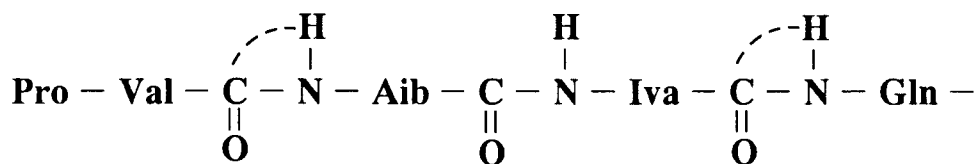
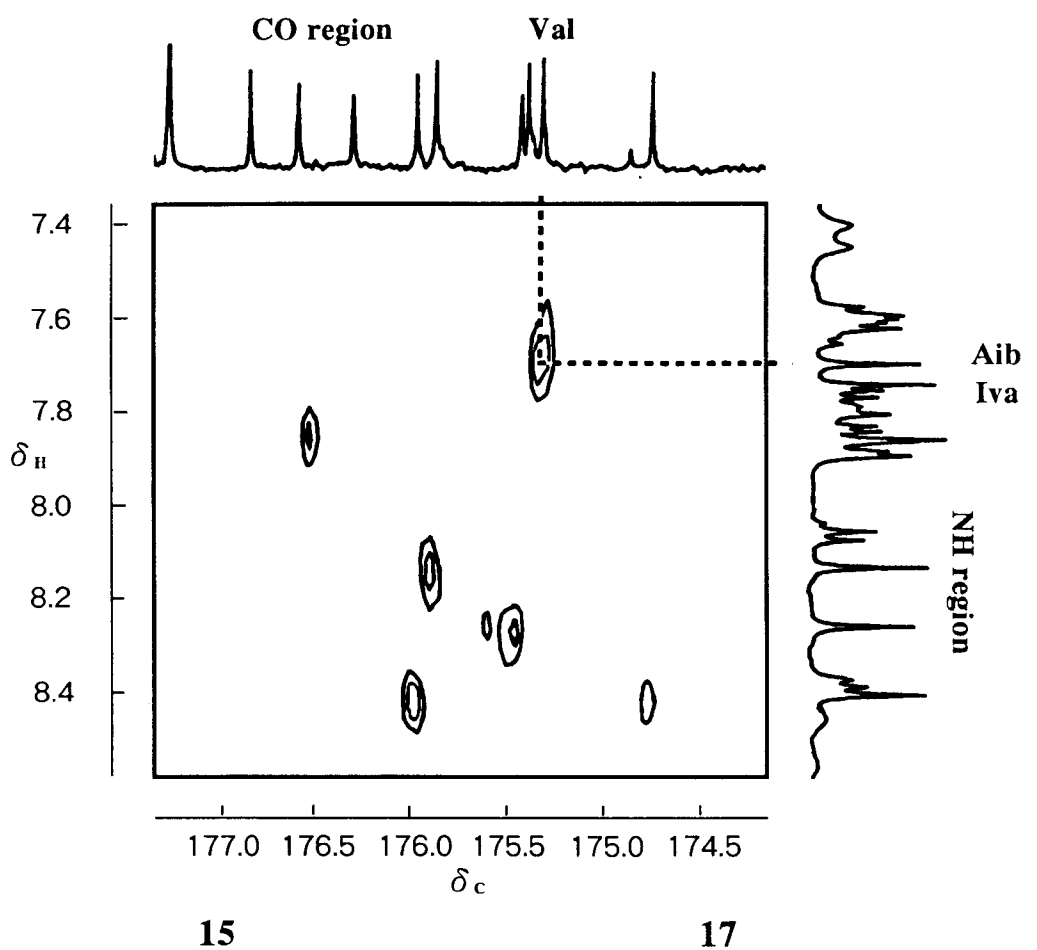
れた。Fig. 15 に示すように、Val<sup>15</sup> CO は Aib<sup>16</sup> NH との間に、また Iva<sup>17</sup> CO は Gln<sup>18</sup> NH との間に CO-NH クロスピークを示したことから、VIb の C-末端オリゴペプチドのアミノ酸配列は、Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol と決定された。また、今まで構造の判明した TS-B 類は全て Pro<sup>14</sup>-Val<sup>15</sup> のアミノ酸配列を有している。それゆえ、IVb と IVd もまた Pro-Val のアミノ酸配列をもち、その 17 位は Iva で置換されていると決定された。

IIIb、IIIc、VIa と VIb の N-末端オリゴペプチドは、異性体関係にある Ile と Leu を有している。VIb に関しては、V と同様に NOESY スペクトルから 9 位に Ile が、12 位に Leu が存在することが明らかになった。9 位と 12 位について以上の結果を考察すると、9 位は Leu、Ile、Val により置換され、12 位は共通して Leu であることが分かる。それゆえ、IIIb、IIIc と VIa の 9 位と 12 位もまた、それぞれ Ile と Leu によって占められていることが推定された。

このようにして決定された TS-B 類の全構造を比較すると、TS-B 類の 3 位、5 位、9 位ならびに 17 位のアミノ酸残基において置換がおこっており、それ以外は、全て同一アミノ酸配列を有する非常に類似したペプチド群であることが明らかになった。また、TS-B 類と既知のペプタイボールの構造と比較すると、TS-B 類は suzukacillin (Table 1) と類似していることが明らかになった。



**Figure 14.** CAD Spectrum of  $m/z$  788 Ion Originating from the C-Terminal Oligopeptide of Trichosporin-B-VIb.



**Figure 15.** Part of the COLOC Spectrum of Trichosporin- B- VIb.

The CO- NH connectivity between the Iva CO and Gln NH is not shown in the above spectrum.

**Table 5.** Diagnostic Ions\* Observed in the FAB Mass and the CAD Spectra of trichosporin – Bs.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	MW (nominal)
TS – B – Ia	128	199	286	357	442	527	<b>655</b>	740	<b>853</b>	938	<b>995</b>	<b>1108</b>	1193	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>367</b>	<b>495</b>	<b>623</b>	774	1965
TS – B – IIIa	128	199	270	341	426	511	<b>639</b>	724	<b>837</b>	922	<b>979</b>	<b>1092</b>	1177	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>367</b>	<b>495</b>	<b>623</b>	774	1949
TS – B – IIIb	128	199	270	341	426	511	<b>639</b>	724	<b>837</b>	922	<b>979</b>	<b>1092</b>	1177	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>353</b>	<b>481</b>	<b>609</b>	760	1935
TS – B – IIIc	128	199	270	341	412	497	<b>625</b>	710	<b>823</b>	908	<b>965</b>	<b>1078</b>	1163	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>367</b>	<b>495</b>	<b>623</b>	774	1935
TS – B – IIId	128	199	270	341	426	511	<b>639</b>	724	<b>823</b>	908	<b>965</b>	<b>1078</b>	1163	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>367</b>	<b>495</b>	<b>623</b>	774	1935
TS – B – IVb	128	199	270	341	426	511	<b>639</b>	724	<b>837</b>	922	<b>979</b>	<b>1092</b>	1177	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>381</b>	<b>509</b>	<b>637</b>	788	1963
TS – B – IVc	128	199	284	355	440	525	<b>653</b>	738	<b>837</b>	922	<b>979</b>	<b>1092</b>	1177	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>367</b>	<b>495</b>	<b>623</b>	774	1949
TS – B – IVd	128	199	270	341	426	511	<b>639</b>	724	<b>823</b>	908	<b>965</b>	<b>1078</b>	1163	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>381</b>	<b>509</b>	<b>637</b>	788	1949
TS – B – V	128	199	270	341	426	511	<b>639</b>	724	<b>837</b>	922	<b>979</b>	<b>1092</b>	1177	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>381</b>	<b>495</b>	<b>623</b>	774	1949
TS – B – VIa	128	199	284	355	440	525	<b>653</b>	738	<b>851</b>	936	<b>993</b>	<b>1105</b>	1191	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>367</b>	<b>495</b>	<b>623</b>	774	1963
TS – B – VIb	128	199	270	341	426	511	<b>639</b>	724	<b>837</b>	922	<b>979</b>	<b>1092</b>	1177	–	<b>197</b>	<b>282</b>	<b>381</b>	<b>509</b>	<b>637</b>	788	1963

\* Bold numbers are ions clearly observed in the CAD spectra.

**Table 6.** Primary Structures of Trichosporin- Bs.

Position	N- terminal oligopeptide <- - - - -> C- terminal oligopeptide																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
TS-B-Ia	Ac-Aib-Ala	Ser	Ala	Aib	Aib	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln-Gln-Pheol
TS-B-IIla	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-IIlb	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Ile	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-IIlc	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Ile	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-IIId	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Ile	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-IVb	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-IVc	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Iva-Gln-Gln-Pheol
TS-B-IVd	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-V	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Ile	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-VIa	Ac-Aib-Ala	Aib	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Ile	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-VIb	Ac-Aib-Ala	Ala	Ala	Aib	Aib	Aib	Gln	Aib	Ile	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Iva-Gln-Gln-Pheol



## 第4章 Trichosporin-B類の $^1\text{H}$ -および $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル

NMRは、TS-B類の純度の確認、構造決定および高次構造の推定に必要不可欠な手法である。TS-B類の分子量は約2000であり、各分子には、プロトンは151~153個、炭素は91~92個含まれる。構造決定の目的には、通常、部分的な帰属でも十分であるが、その高次構造や分子に微細な動きの推定には、その $^1\text{H}$ -および $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおけるシグナルの完全な解析が必要である。

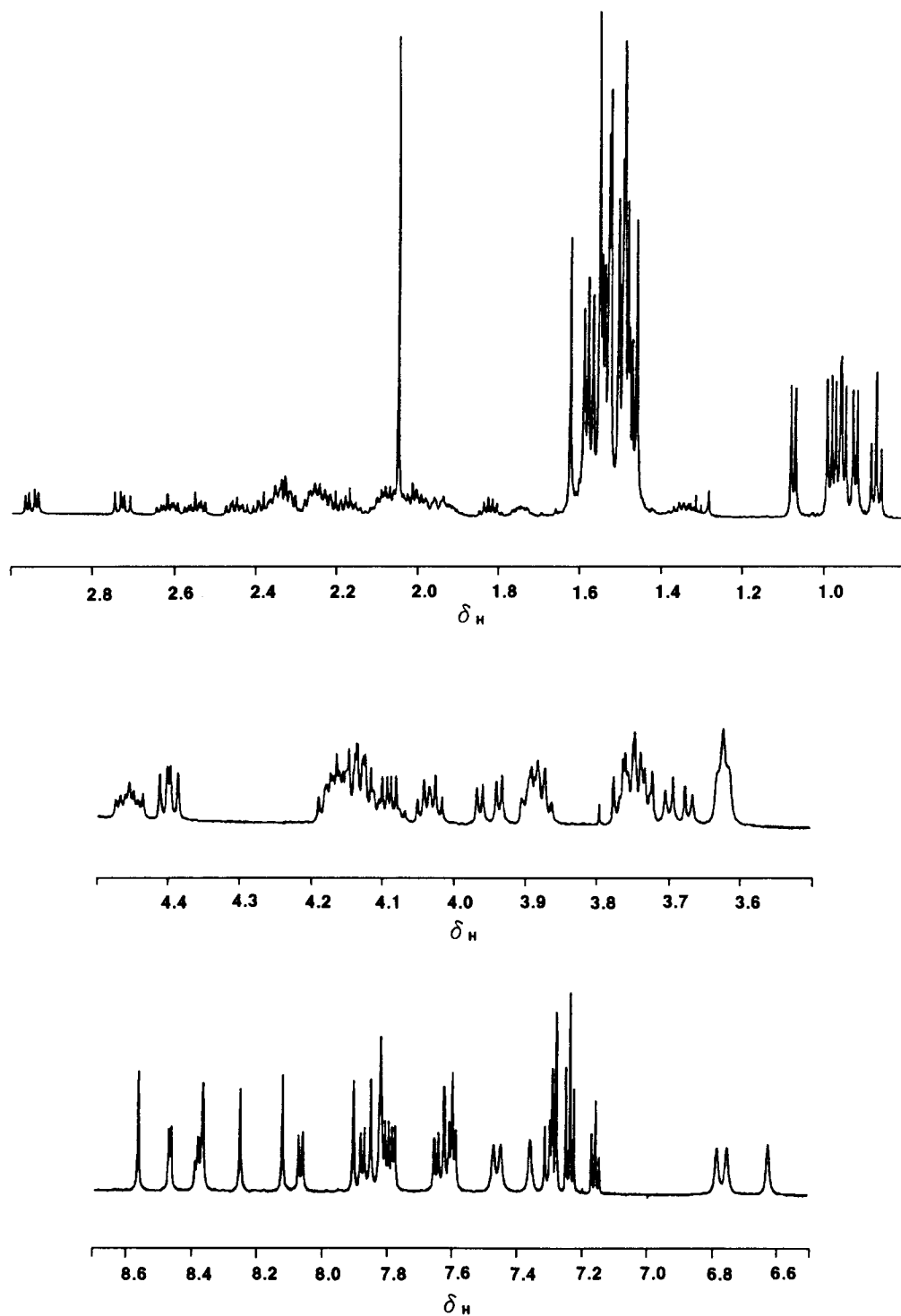
著者は、TS-B類の主成分であるTS-B-Vの $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$ シグナルを、2次元NMRを用いてほぼ完全に帰属した。また、IIIaについてもほぼ完全な帰属を行った。他のTS-B類の $^1\text{H}$ -および $^{13}\text{C}$ -NMRシグナルの帰属は、1次構造あるいは2次構造を知るために、TS-B-IIIaとVのデータに基づき部分的に行った。

### 第1節 Trichosporin-B-Vの $^1\text{H}$ -NMRシグナルの帰属

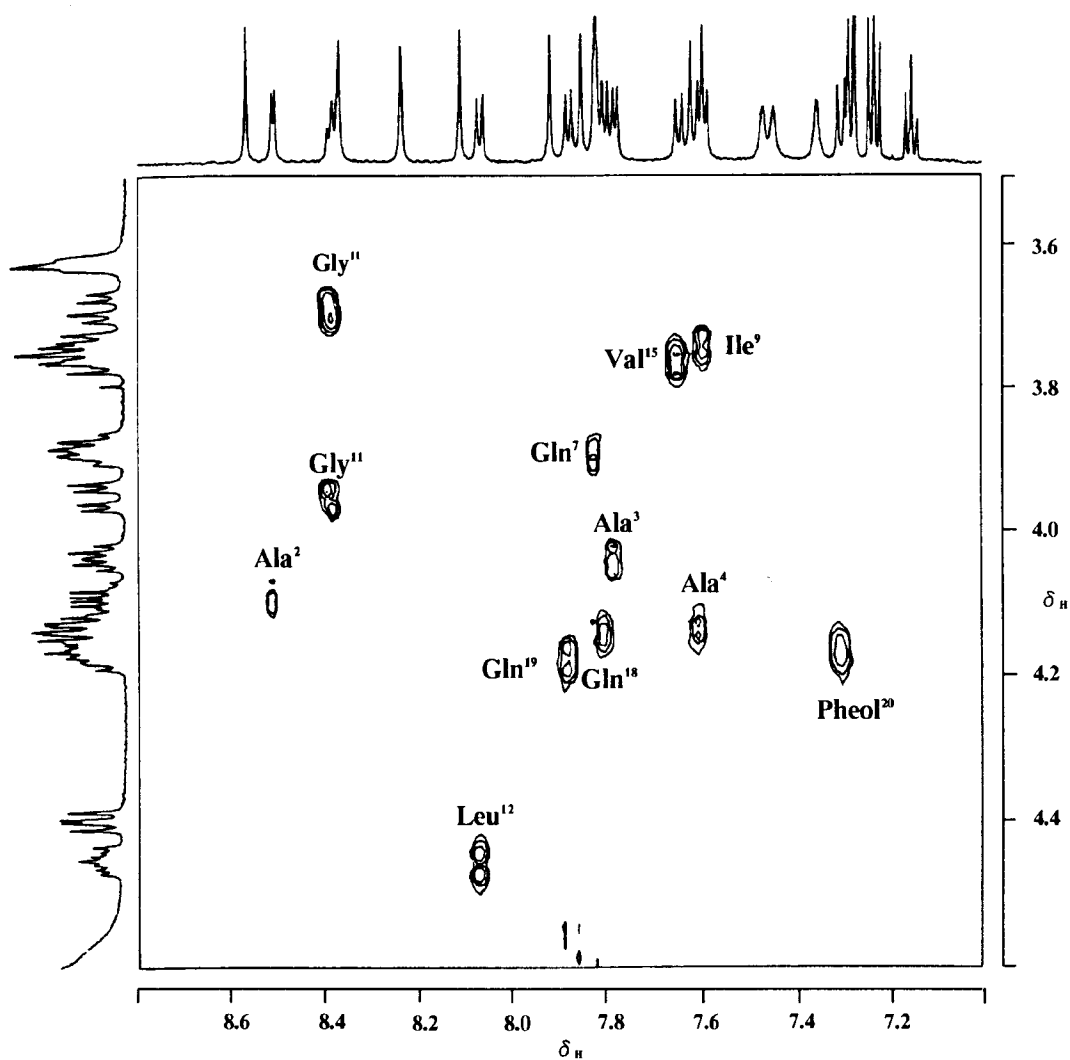
TS-B-Vの $^1\text{H}$ -NMRに現れる各シグナル(Fig. 16)は、COSY、RCT<sup>29)</sup> (Relayed Coherence Transfer Spectroscopy)、HOHAHA<sup>30)</sup> (Homonuclear Hartmann-Harn Spectroscopy)ならびにNOESYの2次元NMRを用いて帰属された。

#### 4-1-1 アミノ酸スピンシステムの帰属

まず、構成アミノ酸とPheolのスピンシステム<sup>31)</sup>をCOSY、RCTおよびHOHAHAスペクトルから同定した。 $\alpha$ -プロトンを持たないAibのスピンシステムは、RCTスペクトルの $\text{NH}-\text{C}^\beta\text{H}_3$ のクロスピークから求めることができるが、すべてクロスピークについては観察されなかった。そのため、Aibの $\text{C}^\beta\text{H}_3$ シグナルのいくつかは、帰属できなかった。このスピンシステムについては、後述のNOESYスペクトルでも同じ結果であった。Fig. 17と18にCOSYスペクトルの $\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}$ 領域とHOHAHAスペクトルの $\text{C}^\alpha\text{H}$ -aliphatic領域を示す。

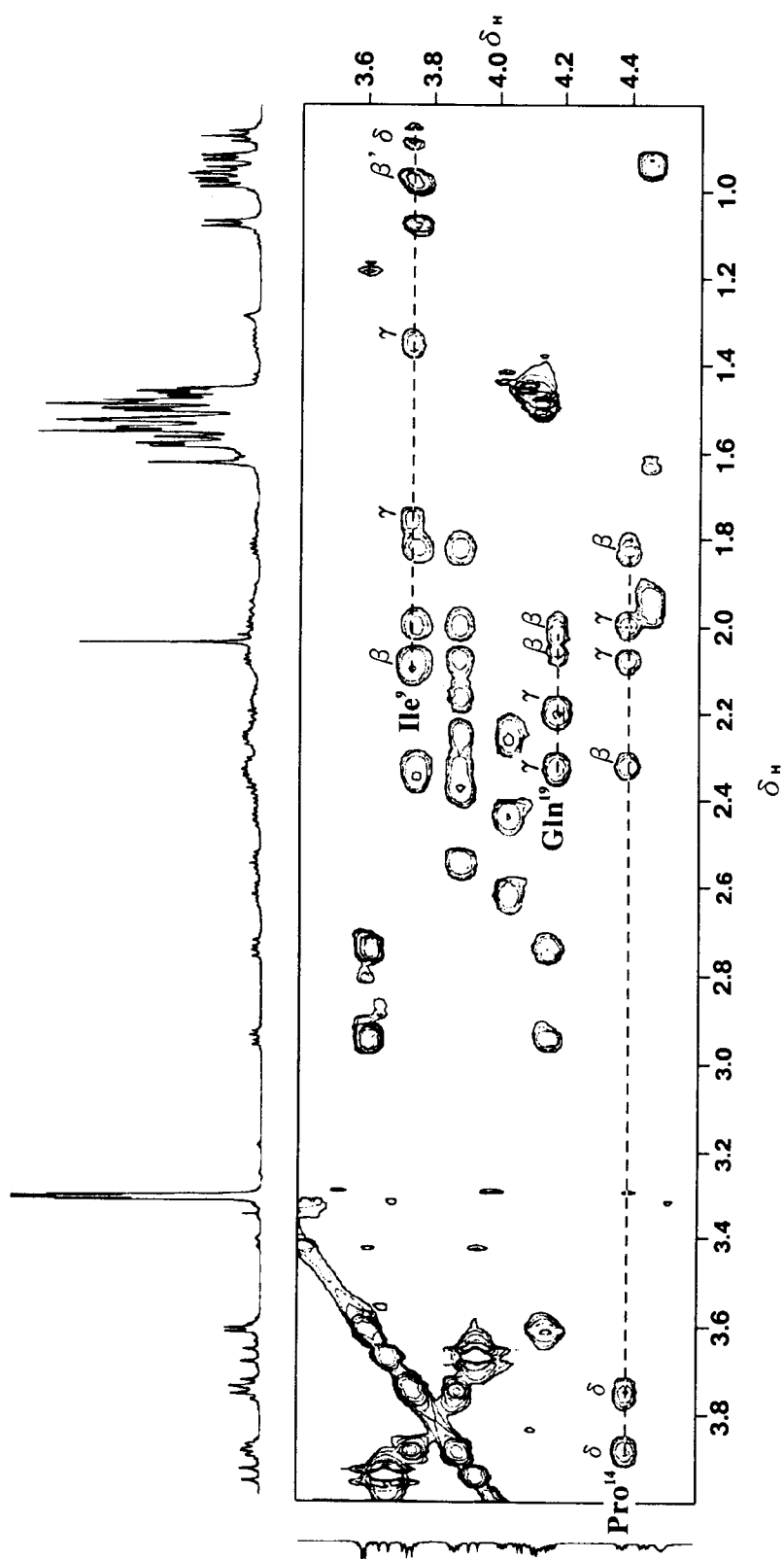


**Figure 16.** 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR Spectrum of Trichosporin-B-V in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at  $27^\circ\text{C}$  (10 mM).



**Figure 17.** Fingerprint Region of the 600 MHz COSY Spectrum of Trichosporin-B-V in CD<sub>3</sub>OH at 27 °C (10 mM).

The NH- C<sup>α</sup> H cross peaks are sequence- specifically assigned.



**Figure 18.**  $C^\alpha H$ - Aliphatic Region of the 600 MHz HOHAHA spectrum of Trichosporin-B-V in  $CD_3OD$  at 27  $^\circ C$  (10 mM).

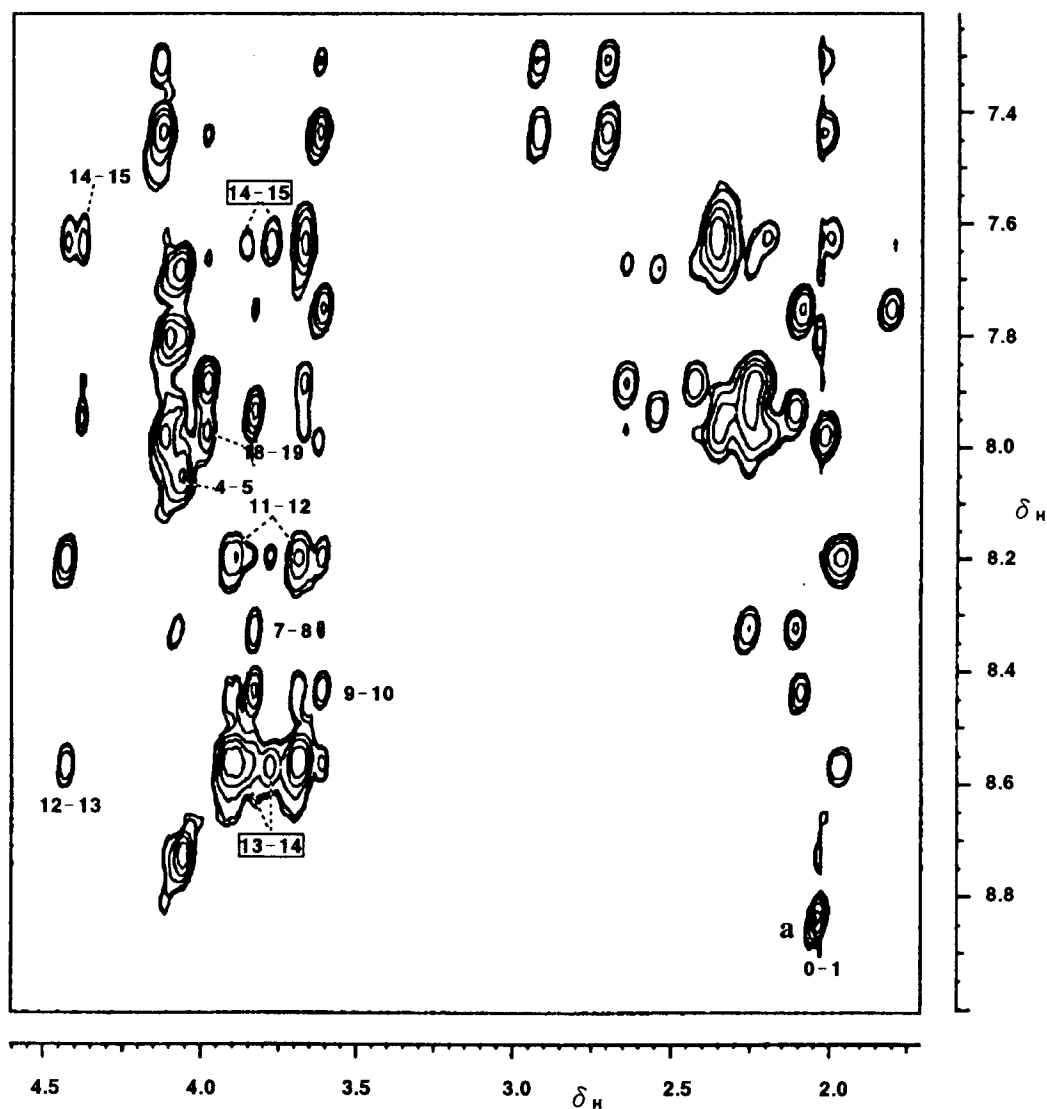
Relayed connectivities originating from  $Ile^9$ ,  $Pro^{14}$  and  $Gln^{19}$   $C^\alpha H$  are indicated by broken lines.

#### 4-1-2 連続帰属

次に Wagner と Wüthrich により提出された方法<sup>32)</sup>を用いて、隣接した残基間で観察される  $d_{NN}(i, i+1)$  型と  $d_{\alpha N}(i, i+1)$  型の NOE (前者は  $i$  番目と  $i+1$  番目の残基の NH 間の NOE を、後者は  $i$  番目の  $\alpha$ -プロトンと  $i+1$  番目の残基の NH 間の NOE を意味する) から、各  $\alpha$ -プロトンと NH シグナルについて連続帰属を行なった。

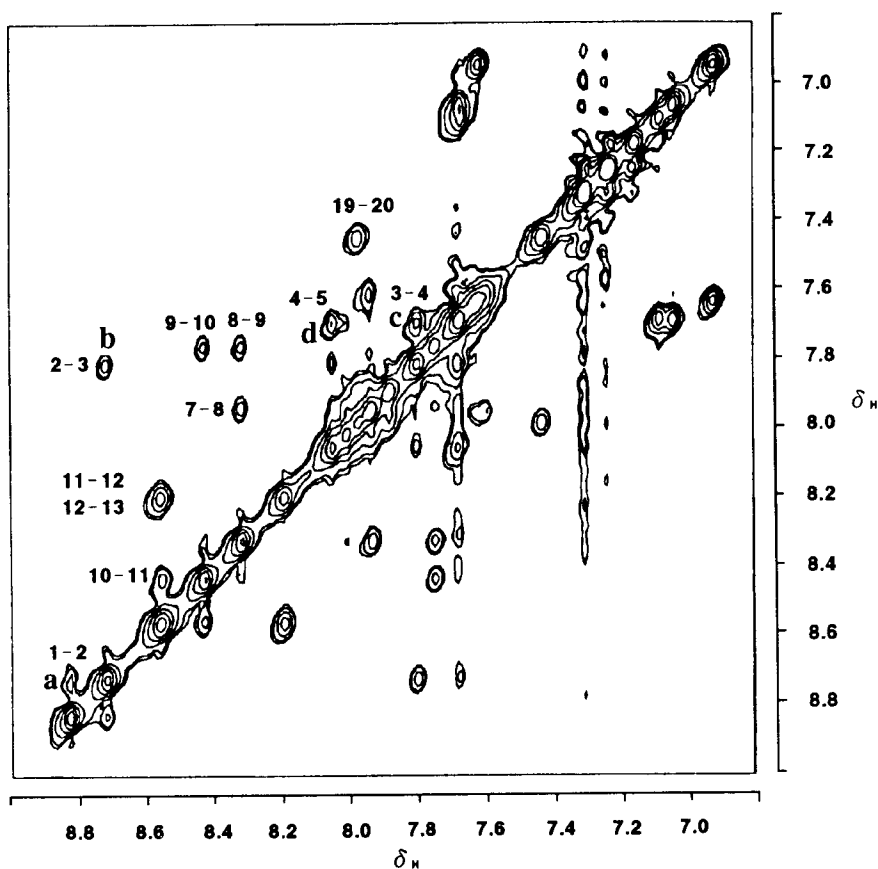
Fig. 19 と 20 に示した TS-B-V の NOESY スペクトルには、sequence-specific な帰属に必要なかつ重要な、アミノ酸残基間の NOE クロスピークが多く認められる。もっとも低磁場に認められる Aib の NH は、アセチル基の  $C^{\alpha}H_3$  とクロスピークを示したので (Fig. 19: a のピーク)、このシグナルは Aib<sup>1</sup> の NH であると帰属された。NH-NH 領域には (Fig. 20)、隣接したアミノ酸残基間の NH-NH クロスピークが、Aib<sup>1</sup> ~ Aib<sup>6</sup> (例: a  $\rightarrow$  d のクロスピーク)、Gln<sup>7</sup> ~ Aib<sup>13</sup> および Gln<sup>18</sup> ~ Pheol<sup>20</sup> の間で連続して観察された (Fig. 20 のレベルでは観察されないものもある)。このような NH-NH によるつながりに加えて、 $\alpha H$ -NH によるつながりも Ala<sup>4</sup> ~ Aib<sup>5</sup>、Gln<sup>7</sup> ~ Aib<sup>8</sup>、Ile<sup>9</sup> ~ Aib<sup>10</sup>、Gly<sup>11</sup> ~ Aib<sup>13</sup>、Pro<sup>14</sup> ~ Val<sup>15</sup>、Gln<sup>18</sup> ~ Gln<sup>19</sup> の間に認められた (Fig. 19)。一方、Val<sup>15</sup> ~ Gln<sup>18</sup> の間には連続した NH-NH クロスピークが認められなかったために、Aib<sup>16</sup> と Aib<sup>17</sup> の NH ( $\delta_H$ , 7.606 と 7.805) を区別することができなかった。しかしながら、 $\delta_H=7.805$  の Aib の  $C^{\beta}H_3$  は Gln<sup>18</sup> の NH との間に  $d_{\beta N}(i, i+1)$  型のクロスピークを示したので、その NH を 17 位に、また残る一方の NH を 16 位に帰属することができた。以上述べたように、高次構造を推定するために必要不可欠な Aib (8 残基)、Ala (3 残基) および Gln (3 残基) の NH と Ala と Gln の  $\alpha$ -プロトンに対して sequence-specific な帰属をすることができた。

また、Aib<sup>13</sup> と Val<sup>15</sup> の NH は、Pro<sup>14</sup> の  $\delta$ -プロトン<sup>33)</sup> (このプロトンは、他のアミノ酸における NH と見なすことができる) と NOE クロスピークを示した (Fig. 19)。これは Pro 残基が、Aib と Val 残基に挟まれていることを示し、FAB MS では直接確認できなかった Aib-Pro 結合の存在を証明している。



**Figure 19.** Part of the 600 MHz NOESY Spectrum of Trichosporin-B-V in CD<sub>3</sub>OH at - 5 °C (60 mM).

The labels are at the  $d_{\alpha N}(i, i+1)$  type- cross peaks. The label, 0, indicates the acetyl group. The labels surrounded by the rectangular frames indicate the connectivities from the Pro<sup>14</sup> C<sup>δ</sup> H<sub>2</sub> to the NHs of Aib<sup>13</sup> and Val<sup>15</sup>.

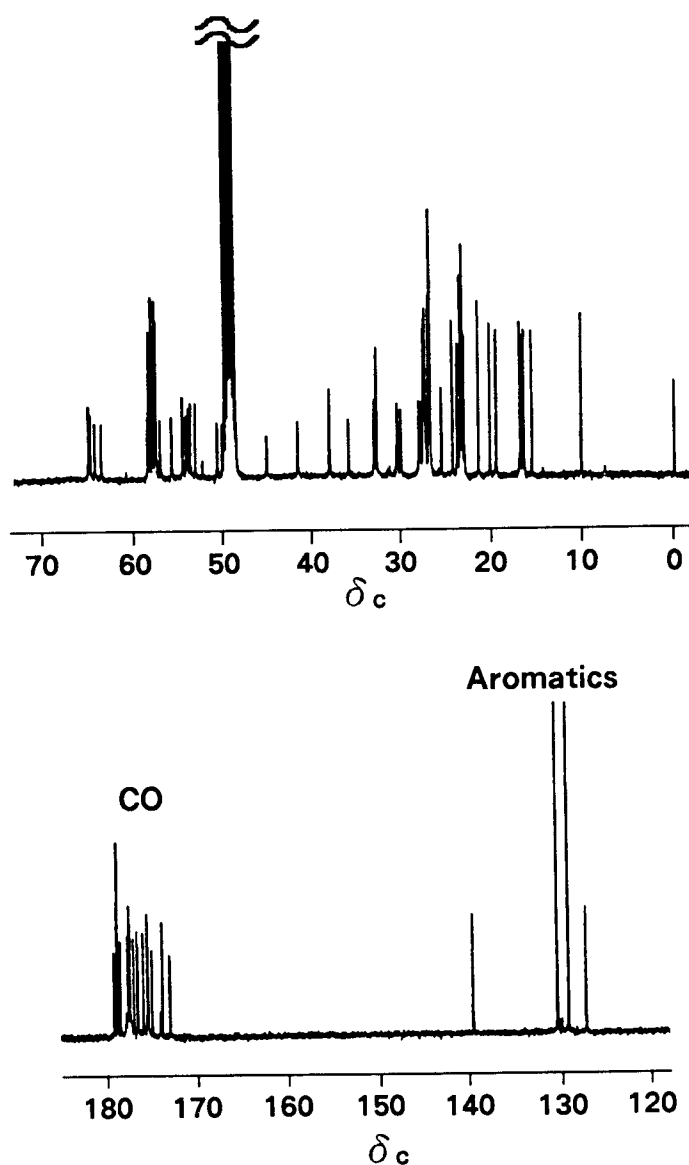


**Figure 20.** NH-NH Region of the 600 MHz NOESY Spectrum of Trichosporin-B-V in CD<sub>3</sub>OH at - 5 °C (60 mM).

The labels are at the  $d_{NN}(i, i+1)$  type- cross peaks.

## 第2節 Trichosporin-B-Vの<sup>13</sup>C-NMRシグナルの帰属

TS-B-Vの<sup>13</sup>C-NMRシグナル (Fig. 21、炭素数91個)の帰属は、<sup>1</sup>Hシグナル帰属の結果に基づいて、DEPT、<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-COSYおよび<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-COLOCを用いて行った。Gln側鎖とAibに由来する炭素の sequence-specificな帰属に関しては多少不明瞭な点があるが、天然のペプチボールの<sup>13</sup>Cシグナルをほぼ完全に帰属した例はTS-B-Vが最初である。



**Figure 21.** 100 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum of Trichosporin-B-V in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 27 °C (60 mM).

#### 4-2-1 プロトンと直接結合した炭素の帰属

TS-B-Vの構成アミノ酸のプロトンと直接結合した $\alpha$ -炭素と側鎖の炭素のシグナルは、そのDEPTスペクトルで炭素の種類を確認後、 $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -COSYスペクトルの $^1J_{\text{CH}}$ -クロスピークから容易に帰属された。Fig. 19と20によりそれぞれ3つのAlaとGlnの $\alpha$ -プロトンはsequence-specificに帰属されているので、それら



の残基の各炭素の帰属は sequence-specific である。他方、Aib の  $\beta$ -炭素は、クロスピークの重なり合いのために、それらは完全には帰属されなかった。

#### 4-2-2 $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ -COLOC スペクトル

$^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY では帰属できない 4 級炭素 (CO 炭素と Aib の  $\alpha$ -炭素) の帰属には、ロングレンジカップリングの観測が可能であり、通常のロングレンジの  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY よりも感度の良い  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -COLOC の手法を用いた。

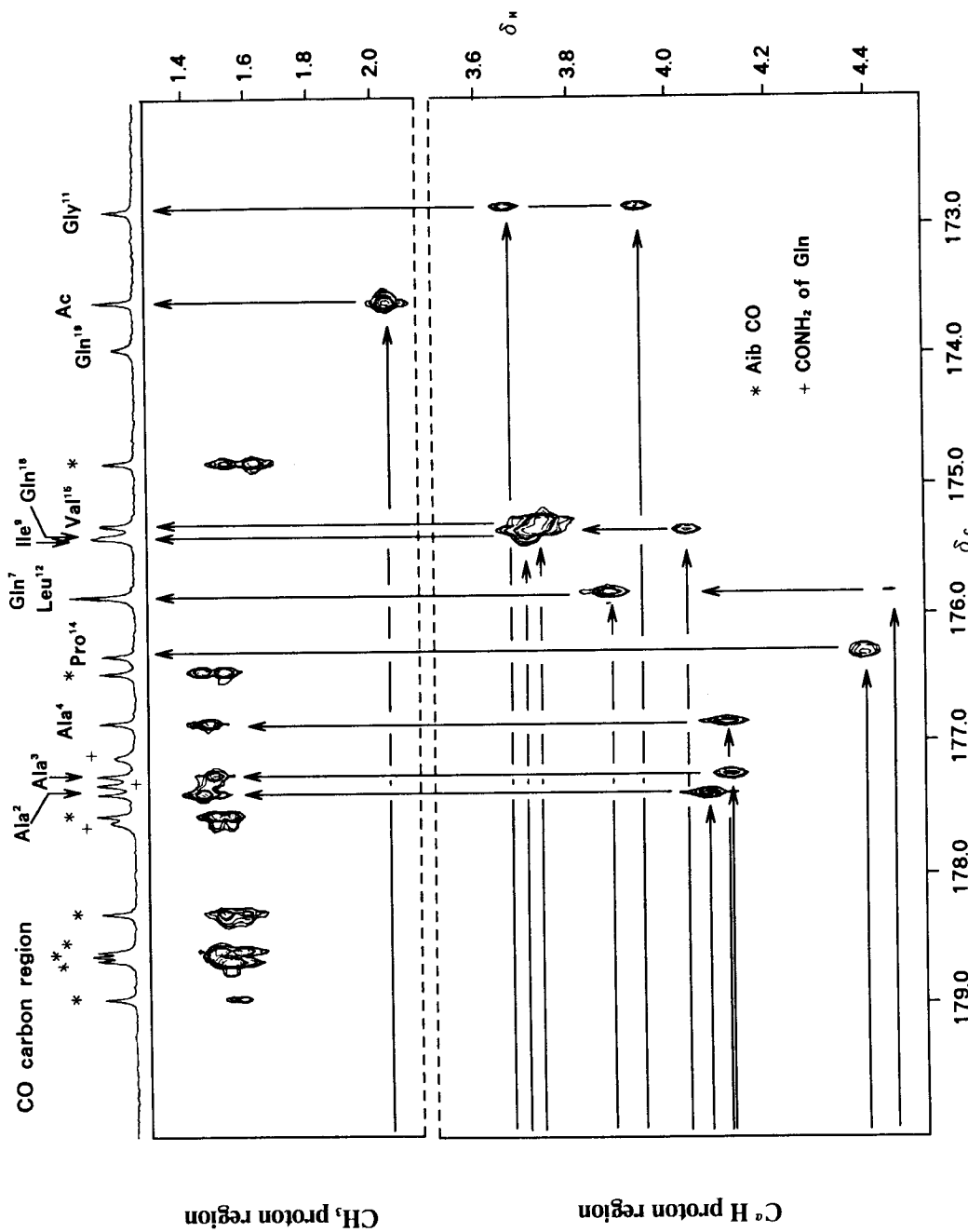
まず、CO 炭素の帰属を行った。TS-B-V は 23 個の CO 炭素 (骨格鎖に 20 個と側鎖に 3 個) を有している。 $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -COLOC スペクトルには、Gln 側鎖の  $\gamma$ -CO 炭素を除いて、これらを完全に帰属し得るクロスピークが観察された。Fig. 22 に示すように、Aib と Ala の CO シグナルはプロトンのメチル領域において、それぞれ  $^3J_{\text{CH}}$ -ロングレンジカップリングによる 2 つと 1 つのクロスピークを示したで容易に区別された。

Fig. 22 の CO- $\text{C}^\alpha\text{H}$  領域において、Aib と Gln<sup>19</sup> を除くすべての残基の CO 炭素は、自身の残基内の  $\alpha$ -プロトンと  $^2J_{\text{CH}}$ -クロスピーク (矢印で示されている) を示し容易に帰属された。また、上記と同様の理由により、Ala 3 残基と Gln<sup>7</sup> と Gln<sup>18</sup> の CO シグナルについて sequence-specific な帰属ができた。

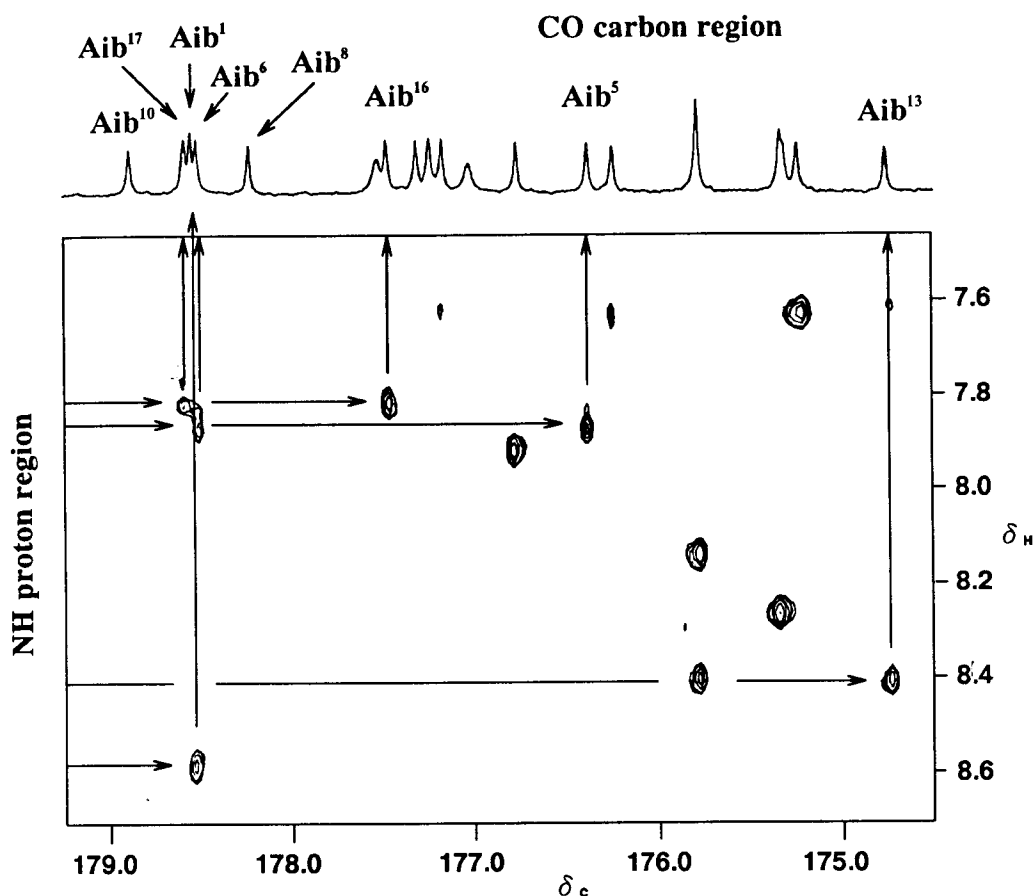
Aib<sup>10</sup> を除く 7 つの Aib 残基の CO 炭素は、その COLOC スペクトルの CO-NH 領域 (Fig. 23) に、 $^2J_{\text{CH}}$ -と  $^3J_{\text{CH}}$ -ロングレンジカップリングによるクロスピークを示した (矢印で示されている)。Aib<sup>13</sup> と Aib<sup>17</sup> の CO 炭素は自身の残基内の NH との間に  $^3J_{\text{CH}}$ -クロスピークを、また残りはそれらに隣接する残基の NH との間に  $^2J_{\text{CH}}$ -クロスピークを示し、sequence-specific に帰属、同定された。

この領域には、上述の既に帰属された CO シグナルも同様のクロスピークを示し、それらを帰属したところ CO- $\text{C}^\alpha\text{H}$  クロスピークから帰属した結果と一致した。また、CO- $\text{C}^\alpha\text{H}$  領域には認められなかった Gln<sup>19</sup> CO 炭素からのクロスピークがこの領域では Pheol<sup>20</sup> の NH との間に  $^2J_{\text{CH}}$ -クロスピークとして観察された。

それゆえ、このような手法によっても帰属することができなかった最も低磁場に認められる Aib の CO シグナル ( $\delta_c$ , 179.30) は、10 位にあてることができる。さらに、直接的な証拠を得るために条件を変えて測定し直したところ、そのス



**Figure 22.** Parts of the  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -COLOC Spectrum of Trichosporin - B - V in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at  $27^\circ\text{C}$  (60 mM).



**Figure 23.** Part of the  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -COLOC Spectrum of Trichosporin-B-V in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at  $27^\circ\text{C}$  (60 mM).

ペクトルには、このCO炭素とGly<sup>11</sup>の $\alpha$ -プロトンとの間に、 $^3J_{\text{CH}}$ -クロスピークが観察されたことから、このシグナルがAib<sup>10</sup>のCO炭素であることが確認された。

Gln残基の側鎖由来の3つのCO炭素は、Fig. 23に示した領域には側鎖のNHとの間の明瞭なクロスピークを示さなかった。しかしながら、Gln<sup>7</sup>の側鎖CO炭素は隣接する $\gamma$ -プロトンとの間に $^2J_{\text{CH}}$ -クロスピークを示し帰属されたが、残り2つ炭素はそのCOLOCスペクトルからは区別できなかった。

残る問題は、Aibの4級 $\alpha$ -炭素 ( $\delta_{\text{C}}$ , 57 ~ 58)の sequence-specificな帰属である。すべてのAibの $\alpha$ -炭素は、自身のNHおよび $\text{C}^{\beta}\text{H}_3$ との間に $^2J_{\text{CH}}$ -クロスビ

ークを示した。しかしながら、前者はそのピークの強度が弱いために、後者はクロスピークの重なり合いのために、Aibの4級 $\alpha$ -炭素の sequence-specific な帰属は多少不完全である。

### 第3節 Trichosporin-B類への HMBC の応用

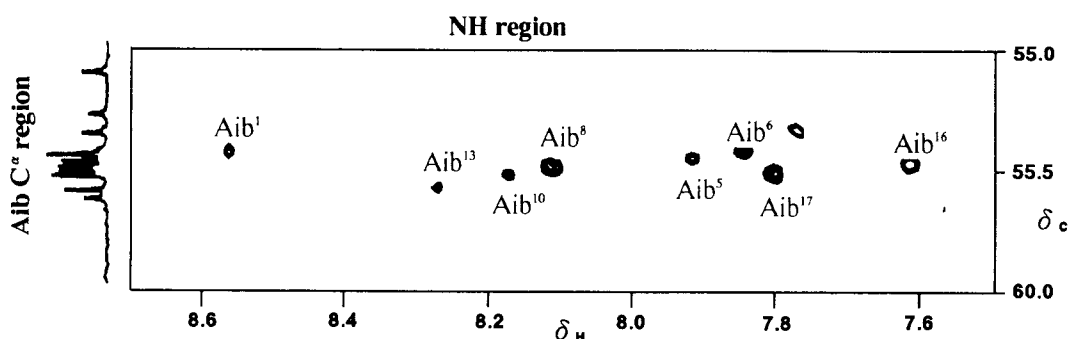
前節で述べたように、TS-B-VのAib残基に由来する4級 $\alpha$ -炭素のシグナルの sequence-specific な帰属は、COLOCスペクトルからは多少の不明瞭さを残した。また、CO炭素のなかにはプロトンと相関を示さないものもあった。そこで、それらの4級炭素のシグナルの明瞭な帰属の目的のために、TS-B-IIIaについてHMBCの手法の適用を試みた。HMBCは、ロングレンジカップリングを観測する点においてCOLOCと同じ結果を与えるが、感度が良い点とクロスピークの強度が強い点において、COLOCより優れた新しい手法である。すなわち、COLOCが $^{13}\text{C}$ を直接検出する手法であり、またそのクロスピークが $^1J_{\text{CH}}$ -カップリングとプロトン-プロトン間のカップリングにより変調するのに対し、HMBCは多量子コヒーレンスにより $^{13}\text{C}$ の情報を感度の良い $^1\text{H}$ に移し、その $^1\text{H}$ を検出する手法でピークは $^1J_{\text{CH}}$ -カップリングにより変調しない。

TS-B-IIIaのHMBCスペクトルにおけるAibの4級 $\alpha$ -炭素とNH領域をFig. 24に示す。TS-B-VのCOLOCスペクトルにおいては明瞭に観察されなかった $^2J_{\text{CH}}$ -カップリングによる $\text{C}^\alpha$ -NHクロスピークがすべてのAibの4級 $\alpha$ -炭素について観察され、sequence-specificに帰属できた。(Fig. 24)。

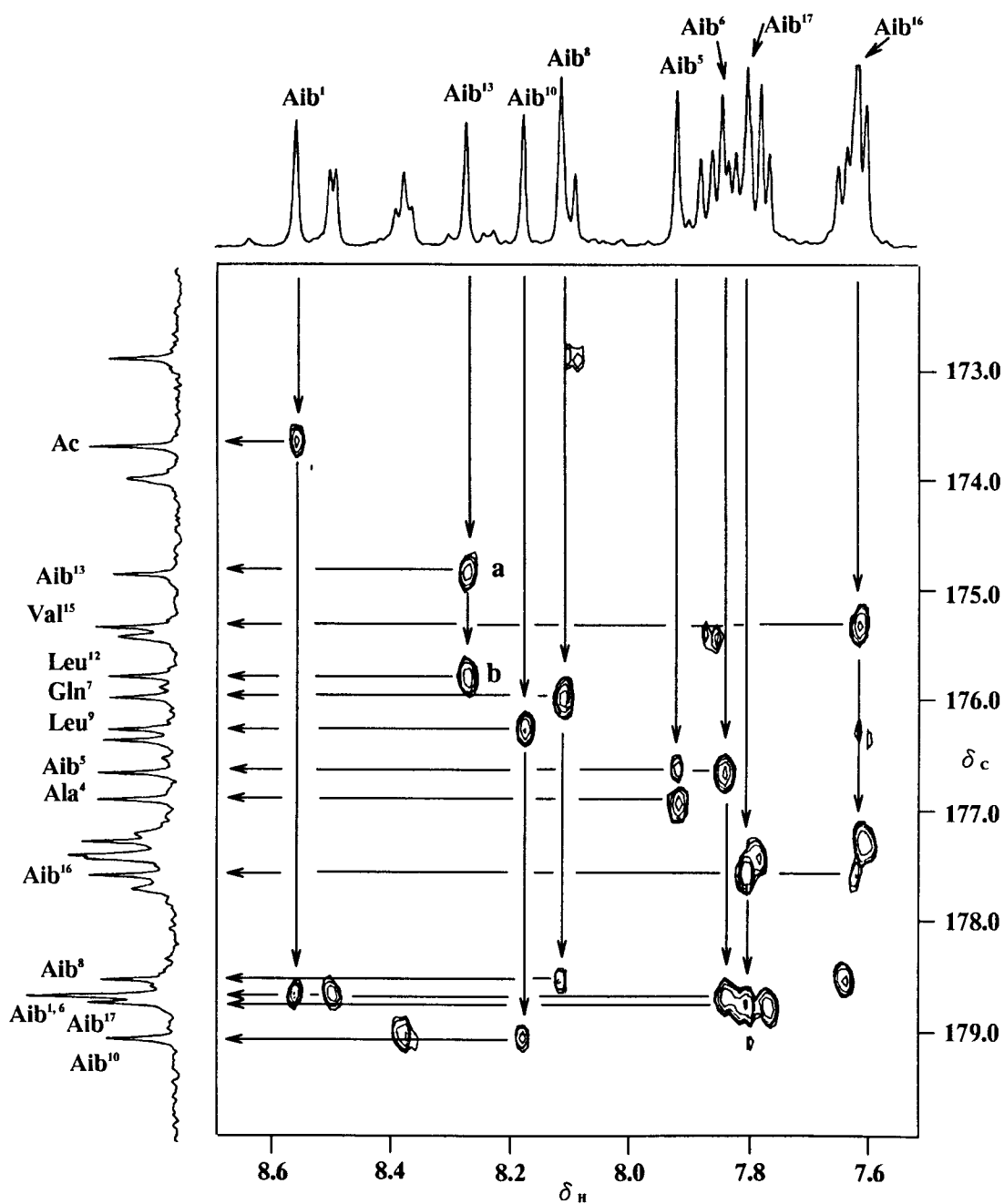
また、HMBCスペクトルのCO-NH領域で観察されたクロスピークに関してCOLOCスペクトルのそれと比較すると、その数は多く、強度も強かった(Fig. 23、25)。COLOCスペクトルではAib<sup>10</sup>のCO炭素と相関を示すNHは認められなかったが、HMBCスペクトルにおいてはすべてのAibのCO炭素はNHとクロスピークを示した。興味あることに、HMBCスペクトルのAibのNHはすべて、それ自身のCO炭素と隣接する残基のCO炭素と、それぞれ、 $^3J_{\text{CH}}$ -と $^2J_{\text{CH}}$ -クロスピークを示した(Fig. 25に矢印で示している)。TS-B-IIIaに含まれる23個のCO

炭素のうち、この領域に Aib の NH と相関を示す CO 炭素は 14 個あり、その 14 個のうち Aib 由来の CO 炭素は、Fig. 22 において説明されたように他の構成アミノ酸と区別することができる。それゆえ、これら 14 個の CO 炭素は sequence-specific に帰属できた。たとえば、Fig. 25 に示される Aib<sup>13</sup> の NH は a と b、2 つのクロスピークを示す。このうち a のクロスピークを示す CO 炭素は、プロトンのメチル領域にまたクロスピークを示し、この CO 炭素が Aib 由来であることが分かる。それゆえ、クロスピーク b を示す CO 炭素は Leu<sup>12</sup> に帰属できる。また、Aib 以外の構成アミノ酸の NH はすべて隣のアミノ酸の CO 炭素と  $^2J_{CH}$ -クロスピーク示した。このように、HMBC スペクトルでは、20 個の骨格鎖に由来する CO 炭素の帰属を CO-NH 領域において観察されるクロスピークのみから行うことができた。

以上の結果から、ペプタイボールのような 4 級アミノ酸を含むペプチドの  $^{13}\text{C}$ -NMR シグナルを帰属するためには、HMBC のほうが COLOC よりもかなり有用であった。



**Figure 24.** Part of the  $\text{C}^\alpha$ -NH region in the HMBC Spectrum of Trichosporin-B-IIIa in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 27 °C (60 mM).



**Figure 25.** Part of the HMBC Spectrum of Trichosporin- B- IIIa in CD<sub>3</sub>OH at 27 °C (60 mM).

## 第5章 Trichosporin-B-Vの2次構造

Alamethicin、suzukacillin等のペプタイボールは、人工リン脂質2重膜に対して、電圧依存性のイオンチャンネルを形成する。<sup>3)</sup> また、alamethicin、trichorzianine類等は、単ラメラ小胞(SUV、Small Unilamellar Vesicle)と共存すると、その分子は凝集し膜中に取り込まれ、その結果としてイオンの膜透過性を増大する。<sup>17)</sup> いずれの場合も、そのペプタイボール分子は、膜の内外で $\alpha$ -helix構造を取ることが必要であると推定されている。それゆえ、ペプチドの2次構造を知ることは、その生物活性の発現機構を推定する上で、重要な知見を与える。一般に、Aib含有ペプチドは、その $\alpha$ -ジメチル基の立体障害から、有機溶媒中でhelix構造を取りやすい。<sup>34)</sup> また、分子が脂溶性であることから、水層では凝集を起こし易い特徴を有している。<sup>35)</sup> TS-B類が、生体膜との間に何らかの相互作用<sup>2)</sup>をしていると推定されることより(第7章参照)、生体膜中の環境に擬似し得る溶媒としてMeOHを選び、その溶媒中での主成分TS-B-Vの詳細な2次構造を明らかにすることを試みた。

### 第1節 Trichosporin-B-Vの円二色性(CD)スペクトル

MeOH中で測定されたTS-B-VのCDスペクトルは、207と221 nmに負のCotton効果による吸収を示し、<sup>19)</sup> このペプチドが右旋性のhelix構造を取ること示した。Fig. 26に-5、25、40°CでのCDスペクトルを示す。CDカーブの温度依存性は、そのhelixの堅固さを示し、温度が低くなるほど堅固になることを示唆している。<sup>19a)</sup>

### 第2節 NMRによる解析

CDスペクトルからは、TS-B-Vの分子が温度依存性のhelix構造を取っていることが示されたが、それ以上のより詳細な2次構造についての情報は得られな

かった。そこで、つぎにNMRを用いての2次構造解析を試みた。

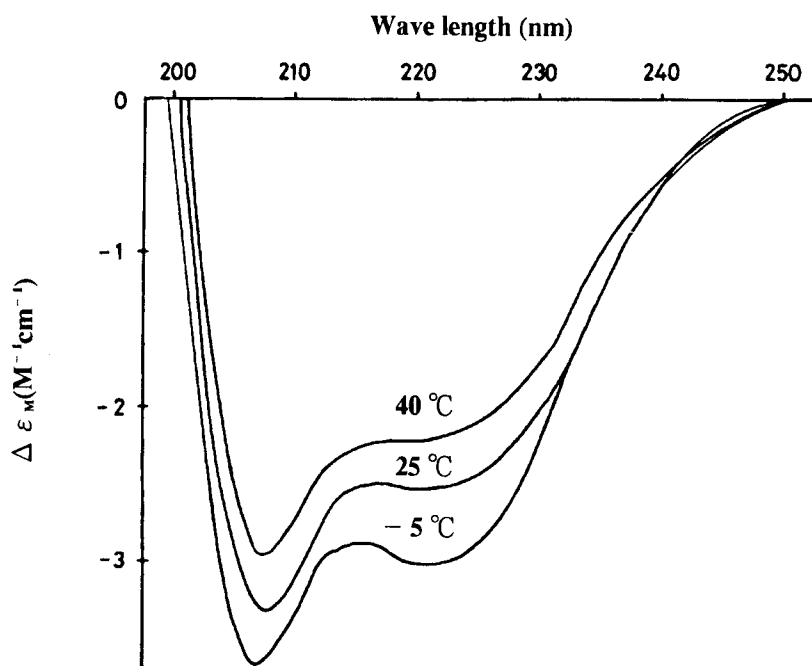


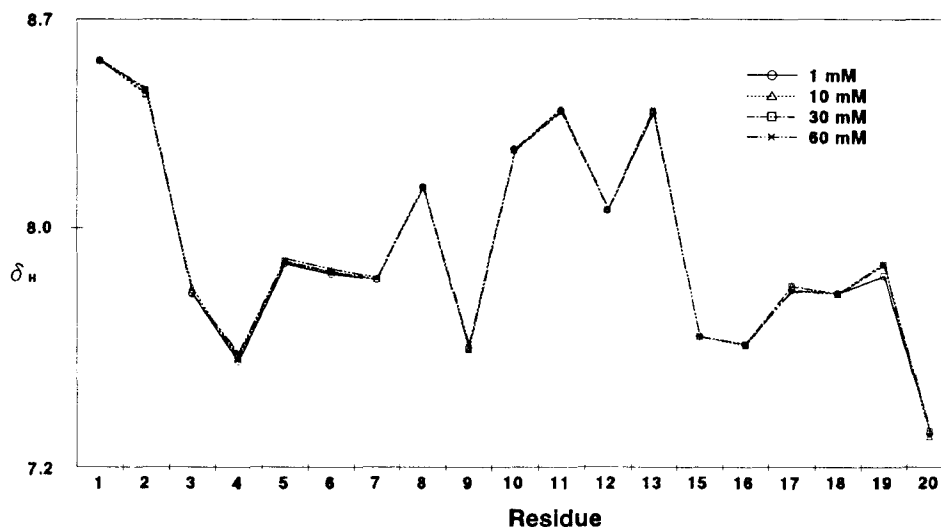
Figure 26. CD Spectra of Trichosporin-B-V in  $\text{CH}_3\text{OH}$  at  $-5$ ,  $25$  and  $40^\circ\text{C}$ .

#### 5-2-1 化学シフトの濃度および温度依存性

NMRを測定する場合、そのサンプル濃度は、CD測定におけるそれと比較するとかなり高い。それゆえ、CDからの構造情報をNMRからのそれと関連させるためには、NMRの測定濃度において分子が凝集していないことを確認する必要がある。分子間水素結合による凝集が生じた場合、その水素結合に関与しているNHは、凝集していない場合と比較すると著しくシフトする。<sup>36)</sup> また、凝集したときのNHの化学シフトは、凝集が起きていない場合とは異なった温度変化を示す。<sup>36)</sup> そこで、1、10、30、60mMの4サンプルを調製し、NHのNMRパラメーターの濃度依存性から凝集の有無を調べた。各サンプルの $^1\text{H}$ -NMRスペクトルの線形はいずれも鋭く、スペクトルだけからその可能性の判断はできなかった。<sup>37)</sup> サンプルごとに、各アミノ酸残基に対して、そのNH化学シフトをプロットすると (Fig. 27)、4つの折れ線はほぼ重なり合い、NH化学シ

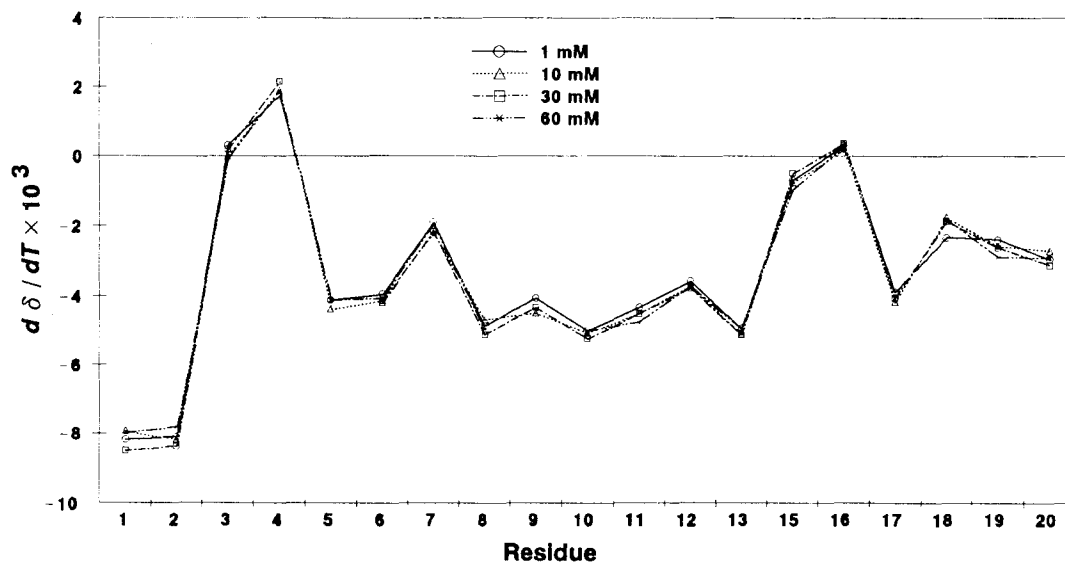


フトに濃度依存性が認められなかった。



**Figure 27.** NH Chemical Shifts of Trichosporin-B-V at Various Concentrations (27 °C).

また、サンプルごとに、各アミノ酸残基に対して、そのNHケミカルシフトの温度変化をプロットしても (Fig. 28)、その4つの折れ線は、ほぼ重なり合い、濃度に関係なく、対応するNHのケミカルシフトは同様の温度変化を示した。これらの結果から、MeOH中においてはTS-B-VのNHは少なくとも60mMまでは



**Figure 28.** Temperature-Dependence of the NH Chemical Shifts of Trichosporin-B-V at Various Concentrations (Obtained in the range 13 – 34 °C).

濃度に関係なく、同一の分子内水素結合をしており、分子間水素結合が存在しないこと、すなわち分子の凝集が起こっていないことが明らかになった。これは、TS-B-V分子が脂溶性であるため、さらには、NHが分子間水素結合より測定溶媒の MeOH との間の水素結合に優先して関与するためであると思われる。

### 5-2-2 $^3J_{NH-\alpha H}$ 値

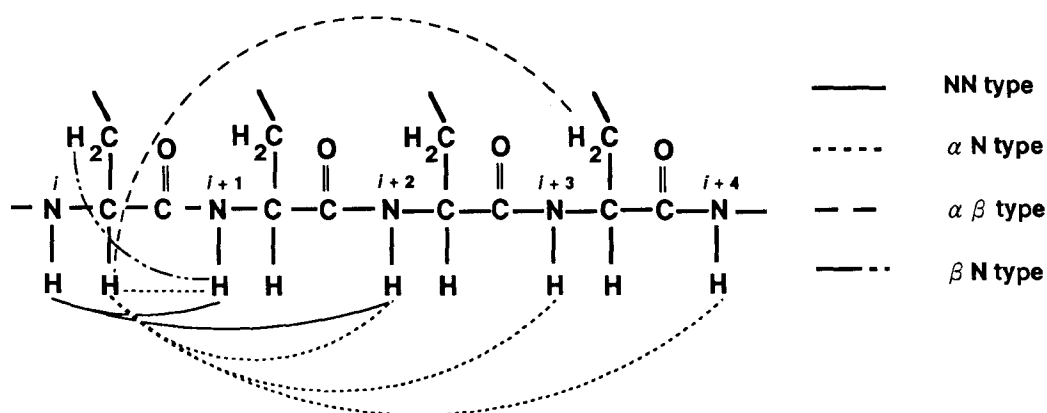
2次構造の情報を与える NMR パラメーターとしての  $^3J_{NH-\alpha H}$  値<sup>38)</sup> (Table 7) は、Gly<sup>11</sup> までは、ほぼ 6 Hz に近い値を示し、TS-B-V 分子の N-末端部分が、規則正しい helix 構造を取ることを示唆している。また、各アミノ酸残基の  $^3J_{NH-\alpha H}$  値が濃度に依存していないことは、その 2 次構造が 60 mM までの濃度で同じであることを示唆している。しかしながら、1 mM における Ala<sup>2</sup> の  $^3J_{NH-\alpha H}$  値は 10 mM、30 mM および 60 mM おいてのそれと比較するとやや大きく、低濃度での N-末端部分の helix 構造は高濃度でのそれより若干フレキシブルであると考えられる。また、Leu<sup>12</sup>、Val<sup>15</sup>、Gln<sup>19</sup> および Pheol<sup>20</sup> は、7~8 Hz の値を示し、Leu<sup>12</sup> 以降の C-末端 helix 構造は、N-末端 helix 構造とは異なる helix 構造をもつか、あるいはよりフレキシブルな構造であることが示唆された。-5℃の低温においては、Gln<sup>18</sup> と Gln<sup>19</sup> の  $^3J_{NH-\alpha H}$  値のみが 27℃における  $^3J_{NH-\alpha H}$  値よりそれぞれ 1 Hz、1.5 Hz 小さくなり変化した。この現象は、このアミノ酸残基の存在する C-末端構造が 27℃付近でややフレキシブルな構造をとり、-5℃で少しリジッドになったことを示している。また、-5℃では Gln<sup>18</sup> と Gln<sup>19</sup> 以外のアミノ酸の  $^3J_{NH-\alpha H}$  値に変化が認められないこの結果は、Leu<sup>12</sup> ~ Val<sup>15</sup> の間はリジッドであるが、N-末端 helix 構造とは少し異なった構造を有していることを示唆している

### 5-2-3 残基間 NOE

プロトン-プロトン間の空間的距離を NOE (Fig. 29) から知り、そのパターンからポリペプチドの 2 次構造を推定する方法は、Wüthrich ら<sup>39)</sup> により確立されている。この方法に基き、TS-B-V の NOESY スペクトルに観察された残基間

**Table 7.**  $^3J_{NH-\alpha H}$  Values of Trichosporin- B- V in CD<sub>3</sub>OH at 27 °C .

	1 mM	10 mM	30 mM	60 mM
Residue	(Hz)	(Hz)	(Hz)	(Hz)
Ala <sup>2</sup>	4.7	4.2	4.0	4.2
Ala <sup>3</sup>	n. d.	6.5	n. d.	6.5
Ala <sup>4</sup>	5.8	6.0	5.9	6.0
Gln <sup>7</sup>	4.7	4.7	4.7	4.5
Ile <sup>9</sup>	6.2	6.1	6.1	6.3
Gly <sup>11</sup>	5.1	5.0	5.1	5.0
Leu <sup>12</sup>	8.0	7.7	7.8	7.7
Val <sup>15</sup>	7.6	7.8	7.7	7.8
Gln <sup>18</sup>	n. d.	5.6	n. d.	5.6
Gln <sup>19</sup>	8.0	7.5	7.7	7.5
Pheol <sup>20</sup>	9.0	9.2	9.2	9.2



**Figure 29.** Diagnostic Interresidual NOEs for Determining High- Order Structures of Polypeptides.

の NOE を調べ (Table 8)、その 2 次構造を推定した。Table 8 の NOE の結果は、低温 ( $-5^{\circ}\text{C}$ ) で得られたものであるので、以下論じる 2 次構造はその温度でのものであるが、(5-2-2) で述べたように  $^3J_{\text{NH}-\alpha\text{H}}$  値にほとんど温度変化が認められないことから、室温 ( $27^{\circ}\text{C}$ ) での 2 次構造もほぼ同じであると考えられる。

隣接したアミノ酸残基間の NH-NH クロスピーク [ $d_{\text{NN}}(i, i+1)$  タイプ] は、N-末端から C-末端までほぼ連続して観察された。この NOE の連続性は、TS-B-V が helix 構造を取ることを意味し、CD スペクトルおよび  $^3J_{\text{NH}-\alpha\text{H}}$  値から得られた結果と一致する。また、 $\alpha$ -プロトンを持つアミノ酸残基の大部分が  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$  タイプの NOE クロスピークを有すること、ならびに  $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$  タイプの NOE クロスピークが観察されたことも、TS-B-V が helix 構造をとることを支持している。

**Table 8.** Interresidual NOEs Observed in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at  $-5^{\circ}\text{C}$  (60 mM).

Residue	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$d_{\text{NN}}(i, i+1)$		○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○		○		○	○	
$d_{\text{NN}}(i, i+2)$				●	●		●		●					●					●		
$d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$	△				△			△		△		△	△		△					△	
$d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$	▲																				
$d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$	◇			◇	◇			◇		◇			◇		◇	◇					
$d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$					◆					◆					◆	◆					
$d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$								☆	☆	☆			☆					☆		☆	

さらに、 $\alpha$ -helix 構造に特徴的な  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$  タイプの NOE が  $\text{Ala}^4$ 、 $\text{Ile}^9$ 、 $\text{Pro}^{14}$  および  $\text{Val}^{15}$  に認められた。また、同時にこの残基には、 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$  タイプの NOE が観察された。以上の NOE の結果を考慮すると、TS-B-V 分子は  $\text{Ala}^4$  から  $\text{Pheol}^{20}$  まで規則正しい  $\alpha$ -helix 構造<sup>34,40)</sup>をとっていると考えられる。しかしな

がら、この推論は、Leu<sup>12</sup>とVal<sup>15</sup>の $^3J_{NH-\alpha H}$ 値から得られた前述の結論とは少し異なり問題として残る。

一方、そのN-末端部分は、 $3_{10}$ -helix構造<sup>34,40)</sup>に特徴的な $d_{\alpha N}(i, i+2)$ タイプのNOEがアセチル基の $\alpha$ -プロトンとAla<sup>2</sup>のNH間に観察されたことから、first turnは $3_{10}$ -helix構造であると考えられる。

#### 5-2-4 H-D交換速度

より微細な2次構造を知るために、測定溶媒をCD<sub>3</sub>OHからCD<sub>3</sub>ODに交換し、交換可能なNHと溶媒のDとの交換速度<sup>41)</sup>から、分子内水素結合に関与しているNHを明らかにした。Table 9に示した値(半減期)は、シグナルの高さがDとの交換によって半分になるまでの時間を表わしている(最初の測定は、溶媒交換から15分後に行われている)。Aib<sup>1</sup>とAla<sup>2</sup>のNHは、15分で完全に交換が終了

**Table 9.** H-D Exchange Rates of the NH Groups at 27 °C.

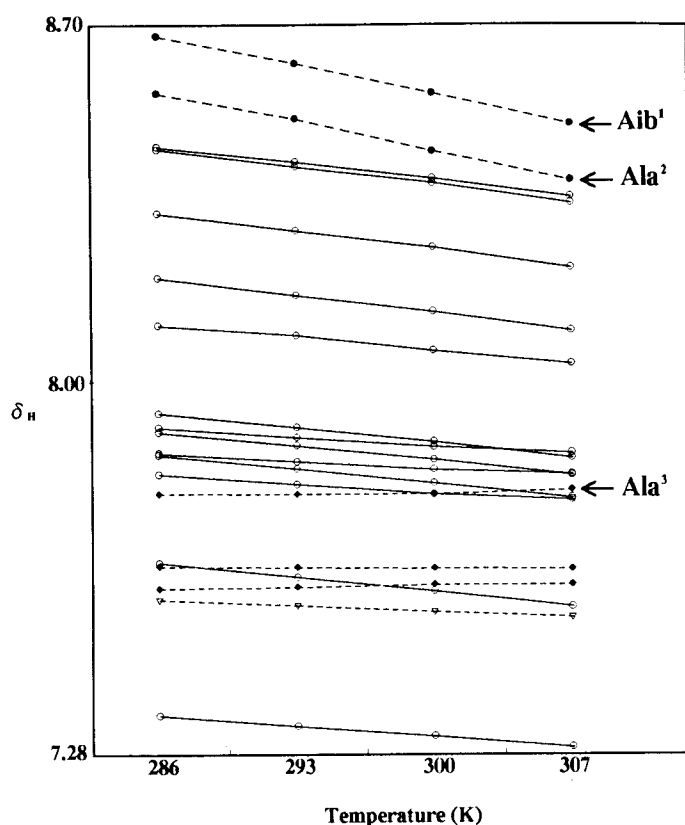
Half-life (hours)			
Aib <sup>1</sup>	≪ 0.25	Gly <sup>11</sup>	≐ 15
Ala <sup>2</sup>	≪ 0.25	Leu <sup>12</sup>	> 24
Ala <sup>3</sup>	≐ 2	Aib <sup>13</sup>	≐ 12
Ala <sup>4</sup>	≐ 3	Pro <sup>14</sup>	—
Aib <sup>5</sup>	≐ 3	Val <sup>15</sup>	≫ 24
Aib <sup>6</sup>	≫ 24	Aib <sup>16</sup>	> 24
Gln <sup>7</sup>	≫ 24	Aib <sup>17</sup>	≫ 24
Aib <sup>8</sup>	≫ 24	Gln <sup>18</sup>	≫ 24
Ile <sup>9</sup>	≫ 24	Gln <sup>19</sup>	> 24
Aib <sup>10</sup>	≫ 24	Pheol <sup>20</sup>	> 24

しており、その半減期は求めることはできなかった。これは、Aib<sup>1</sup>とAla<sup>2</sup>のNHが分子内水素結合にまったく関与していないことを示している。一方、Aib<sup>6</sup>以降のNHは交換速度が遅く、それらが十分に強い分子内水素結合に関与していることを示している。Gly<sup>11</sup>とAib<sup>13</sup>のNHの交換速度が速いのは、この部分がリジットであることを考慮すると(5→2→2)、その水素結合が弱いのではなく、NHがより溶媒に露出しているためであると考えられる。

Ala<sup>3</sup>、Ala<sup>4</sup>、Aib<sup>5</sup>のNHの交換速度は中間的な値を示し、その水素結合はAib<sup>6</sup>以降のNHほど強力ではないが、これらのNHも分子内水素結合に関与していることを意味する。もし分子全体が $\alpha$ -helix構造を取るならば、Ala<sup>3</sup>のNHは水素結合に関与しないので、この結果は、N-末端部分が規則正しい $\alpha$ -helix構造でないこと、すなわち、Ala<sup>3</sup>のNHはアセチル基のCOと水素結合(4→1結合)をしており、27℃でもそのfirst turnは<sub>310</sub>-helix構造であることを意味している。Ala<sup>3</sup>のNHが水素結合に関与していることは、Aib<sup>1</sup>とAla<sup>2</sup>のNHは測定温度が高くなるにつれて高磁場シフトしているのに対して、Ala<sup>3</sup>のNHは逆に低磁場シフト<sup>11a, 40b)</sup>していることから明らかである(Fig. 30)。

しかしながら、Ala<sup>4</sup>以降が $\alpha$ -helix構造であることを考慮すると、first turnが<sub>310</sub>-helix構造で固定されているならば、Aib<sup>5</sup>のNHは全く分子内水素結合に関与していないことになり(Fig. 31 c)、H-D交換速度から得られた結果と一致しない。これは、N-末端部分の構造が27℃では少しフレキシブルで、4→1結合による<sub>310</sub>-helix構造と5→1結合による $\alpha$ -helix構造が、同時に平衡状態で存在すると考えると矛盾しない(Fig. 31 b, c)。

NOEならびに分子内水素結合の結果を考慮すると、Aib<sup>6</sup>以降のNHは規則正しく5→1結合をしていると考えられる。しかしながら、もし、そのような分子内水素結合様式を取るならば、分子モデルによる考察から、Gly<sup>11</sup>とAib<sup>13</sup>のCOとProのピロリジン環との間に大きな立体障害を生じることが分かる(Fig. 32)。その立体障害を解消すると同時に、さらにNOEのデータから考えられるPro<sup>14</sup>以降が $\alpha$ -helix構造であること、ならびにVal<sup>15</sup>以降のNHは十分に強い水素結合に関与していることを満足させるためには、Leu<sup>12</sup>のCOとVal<sup>15</sup>のNHとの間に1つ4→1結合を挿入させなければならない。その分子内水素結合様式<sup>42)</sup>をFig. 33

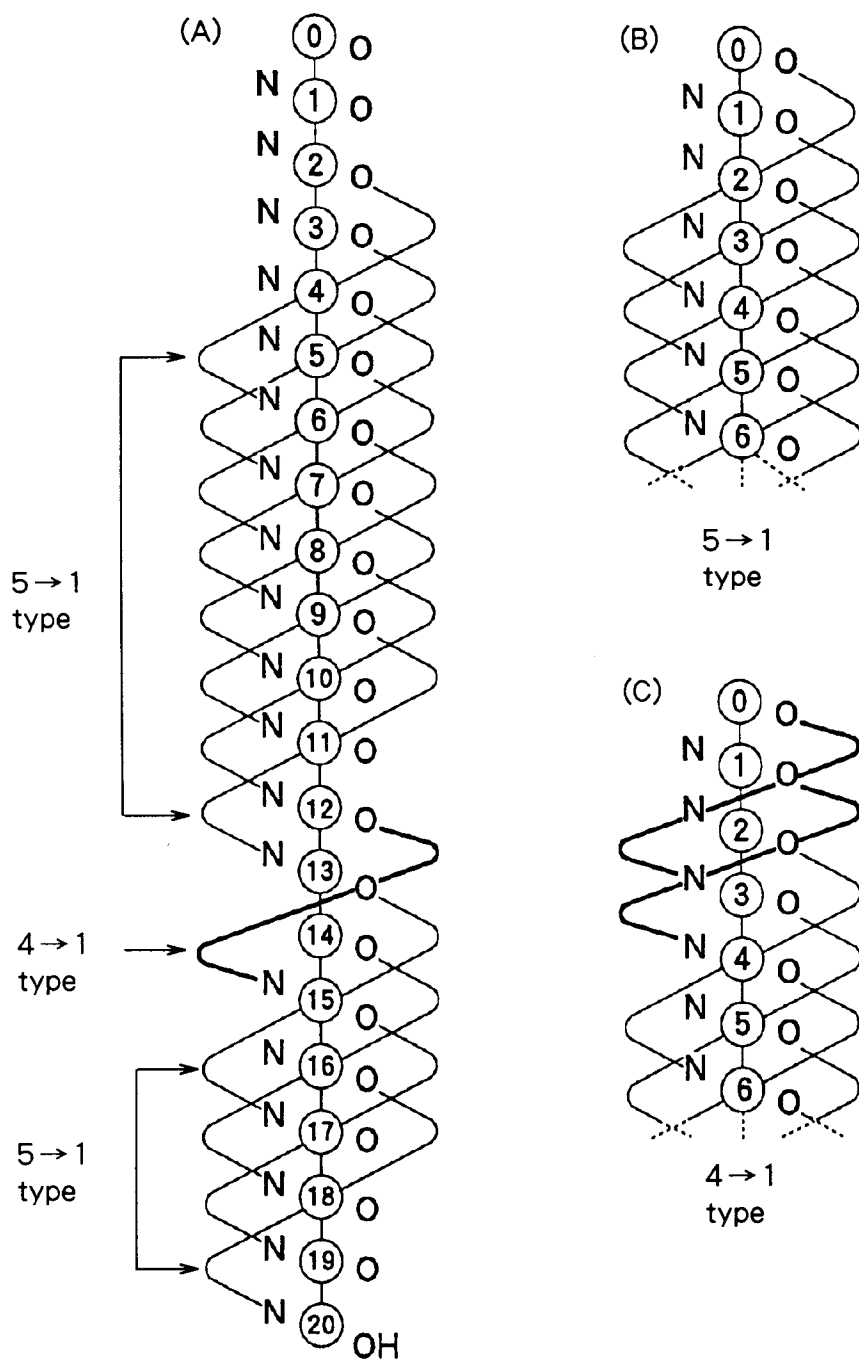


**Figure 30.** Temperature-Dependence of the NH Chemical Shifts of Trichosporin-B-V in  $\text{CD}_3\text{OH}$ .

に示す。したがって、Aib<sup>6</sup>以降の水素結合様式は、Fig. 31 (a)に示すように決定された。

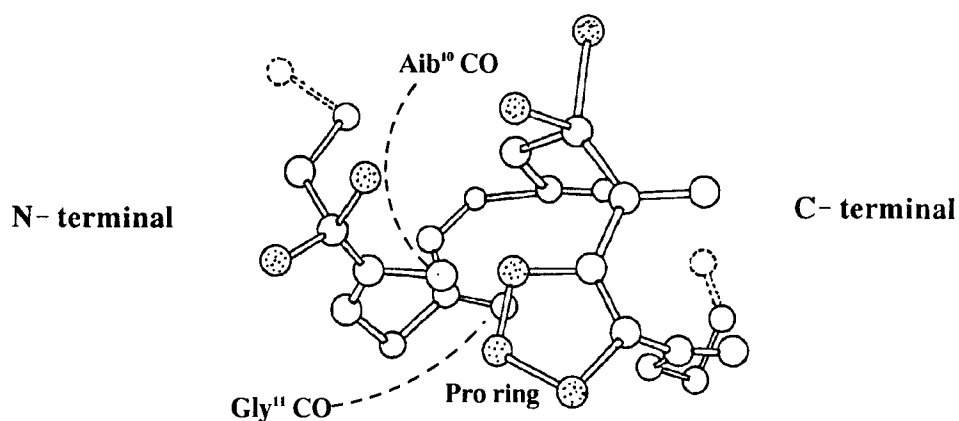
結論として、TS-B-VのMeOH中での2次構造は、次のようにまとめることができる。

- ① First turnは、低温では4→1結合による $3_{10}$ -helix構造に固定されている。室温ではそのN-末端部分は、ややフレキシブルで $3_{10}$ -helix構造と5→1結合による $\alpha$ -helix構造が共存した状態にある。
- ② First turn以降は、5→1結合による $\alpha$ -helix構造がC-末端まで続くが、途中で4→1結合が1つ挿入された構造をもつ。
- ③ それゆえ、helixの軸は2か所で折れ曲がっている。
- ④ そのC-末端部分も、ややフレキシブルであるが室温でも十分に堅固な $\alpha$ -

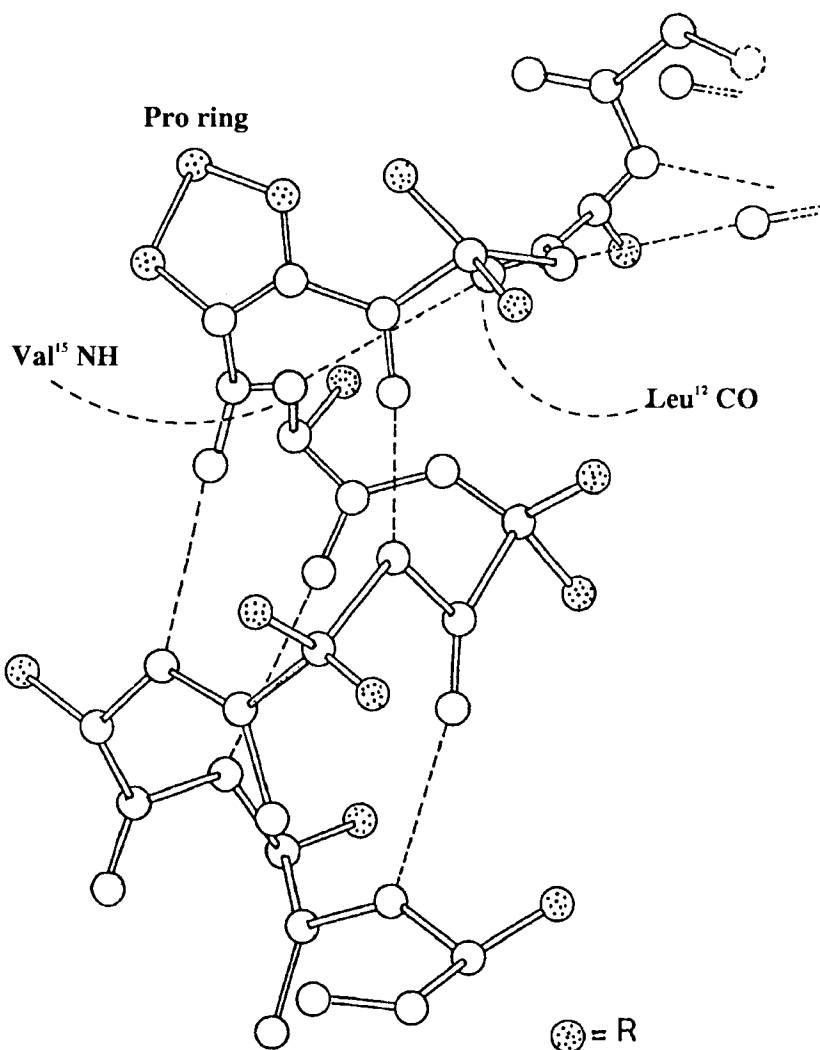


**Figure 31.** Intramolecular Hydrogen Bonding Patterns for Trichosporin- B- V in CH<sub>3</sub>OH.





**Figure 32.** Steric Repulsion owing to the Pro Residue.



**Figure 33.** Insertion of a 4 → 1 Hydrogen Bond between the Leu<sup>12</sup> CO and the Val<sup>15</sup> NH.

helix 構造を維持している。

## 第6章 Trichosporin-B-Vの合成

### 第1節 合成の目的と概略

TS-B類の生物活性試験を行うために、それらを天然から必要十分量で、かつ純粋に得ることは非常に困難である。そこで、生物活性試験に供する目的と、また同時に構造確認の目的で、主成分 TS-B-V の合成を試みた。

TS-B-Vの合成を計画するにあたり、TS-B-Vは立体障害の大きいアミノ酸 Aib が 20 残基中 8 残基を占めるため、その全収率はかなり低いものになると予想された。しかしながら、予備実験として、Z-X-OH (X = Aib、Gln、Ile、Leu) を H-Aib-OMe と簡便な DCC-additive 法で縮合させたところ、比較的良い収率でジペプチドが得られたので、この方法は、TS-B-V の合成に有用であると期待された。Fig. 34 に、TS-B-V の合成スキームを示す。

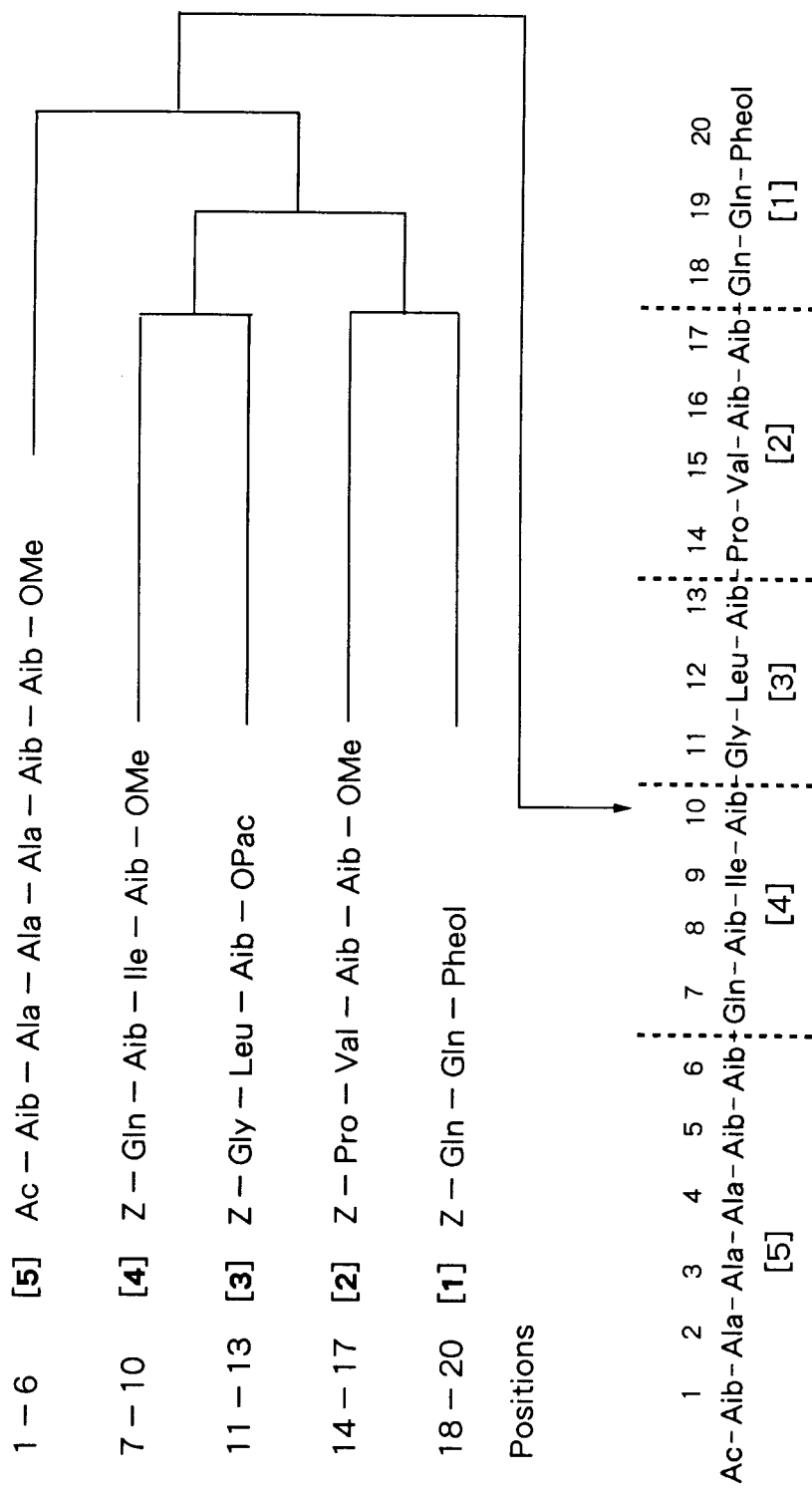
この合成法は、

① Table 10 に示されるように、5 つのフラグメントのうちフラグメント [1] と [3] は、全ての TS-B 類の合成に共通に用いることができる。また、フラグメント [2]、[4]、[5] も、多くの TS-B 類と共通性を有する。

② フラグメント [2]-[5] はいずれも、C-末端に  $\alpha$ -プロトンを持たない Aib を有し、これはエステルのアルカリ加水分解と酸成分の活性化の際のラセミ化を防ぐことができる。

という利点を有している。

保護ペプチドの純度は、薄層クロマトグラフィー、元素分析および NMR により確認した。アミノ酸分析は、Aib のニンヒドリン呈色率が低いため、最終生成物に対してのみ行ない、保護ペプチドの段階では行わなかった。各フラグメントの構造は、 $^1\text{H}$ -と  $^{13}\text{C}$ -NMR および EI (Electron Impact) MS あるいは FAB MS により確認した。



**Figure 34.** Synthetic Route to Trichosporin-B-V.

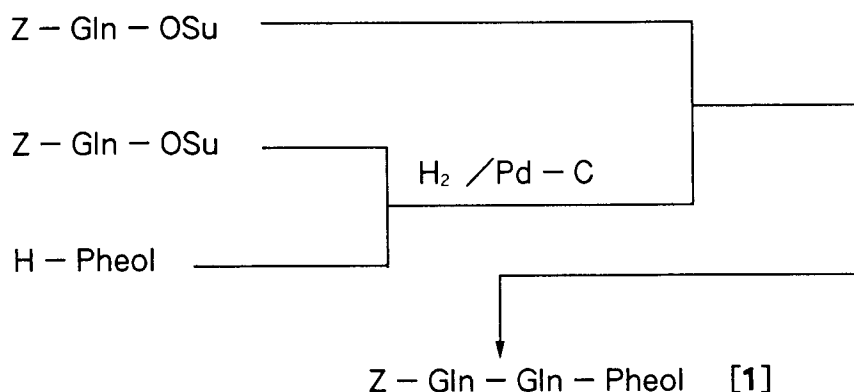
**Table 10.** Primary Structures of Trichosporin- Bs.

	Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Trichisporin-B																					
V		Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol																			
				[5]				[4]				[3]		[2]					[1]		
Ia		Ac-Aib-Ala-Ser-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib																			
												[3]		[2]					[1]		
IIIa			[5]					Gln-Aib-Leu-Aib				[3]		[2]					[1]		
IIIb			[5]					[4]				[3]		Pro-Val-Aib-Ala					[1]		
IIIc		Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Ala-Aib																			
								[4]				[3]		[2]					[1]		
IIId			[5]					Gln-Aib-Val-Aib				[3]		[2]					[1]		
IVb			[5]					Gln-Aib-Leu-Aib				[3]		Pro-Val-Aib-Iva					[1]		
IVc		Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Val-Aib																			
												[3]		[2]					[1]		
IVd			[5]					Gln-Aib-Val-Aib				[3]		Pro-Val-Aib-Iva					[1]		
VIa		Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib																			
								[4]				[3]		[2]					[1]		
VIb			[5]					[4]				[3]		Pro-Val-Aib-Iva					[1]		
[1]: Gln-Gln-Pheol [2]: Pro-Val-Aib-Aib [3]: Gly-Leu-Aib [4]: Gln-Aib-Ile-Aib [5]: Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-																					

## 第2節 保護 trichosporin-B-V の合成

### 6-2-1 保護 trichosporin-B-V (18-20位)、Z-Gln-Gln-Pheol [1] の合成

C-末端トリペプチド<sup>6b,43)</sup>は、Fig. 35に示すようにSu法により stepwise に合成した。保護トリペプチド [1] のZ基は、[1] の MeOH に対する極めて低い溶解度のために、通常の接触還元でうまく除去できなかったが、30% HBr/AcOH により容易に除去できた。脱保護トリペプチド HBr 塩は、吸湿性が高かったので、Amberlite IRA-400 で処理し、遊離の非吸湿性化合物とした。



**Figure 35.** Synthtic Scheme for the C- Terminal Tripeptide [1] (Positions 18-20).

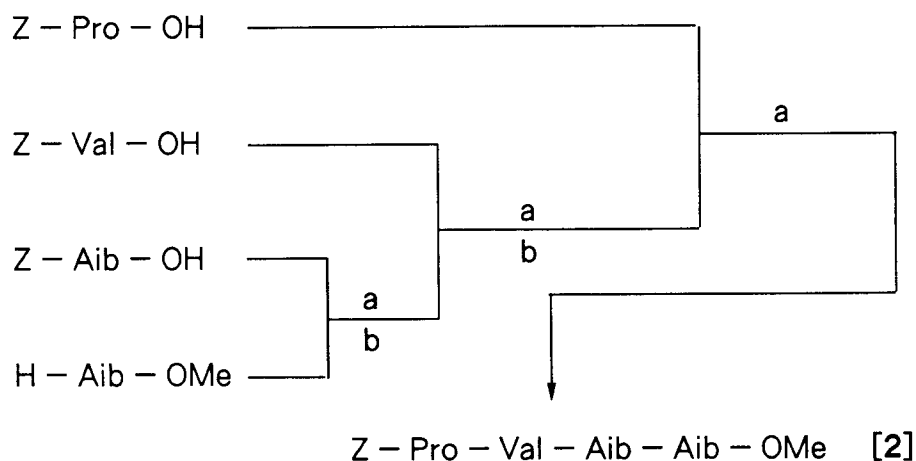
### 6-2-2 保護 trichosporin-B-V (14-20位)、Z-Pro-Val-Aib-Aib-OMe [2] の合成

保護テトラペプチド [2] は、DCC-HOBt 法により stepwise に合成した (Fig. 36)。CD<sub>3</sub>OD 中で測定した [2] の <sup>13</sup>C-NMR スペクトルには、Pro の β-炭素に対応する 2 本のシグナルが認められた。このことは、MeOH 中においてフラグメント [2] の Pro が cis- trans 異性状態にあることを示唆している (trans, δ<sub>c</sub> = 31.1、cis, δ<sub>c</sub> = 32.4)。<sup>44)</sup>

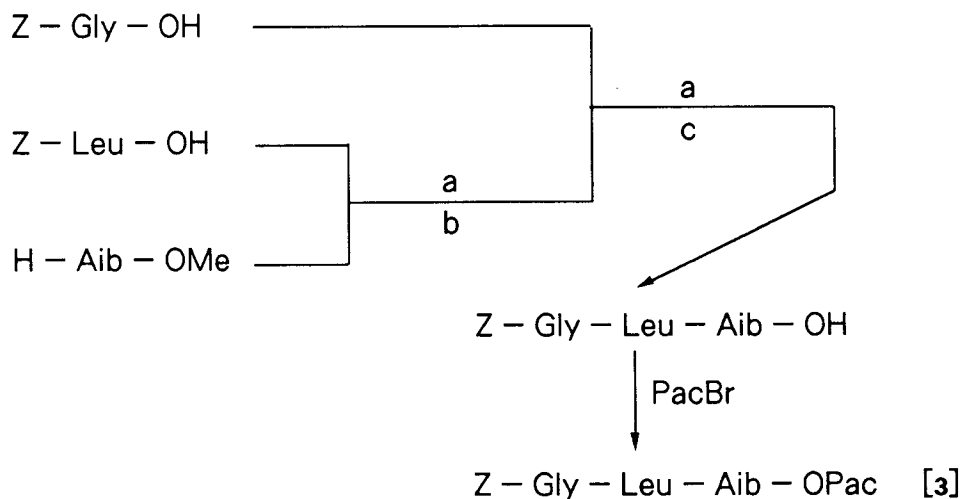
### 6-2-3 保護 trichosporin-B-V (11-13位)、Z-Gly-Leu-Aib-OPac [3] の合成

フラグメント [3] は、対応するメチルエステル体とのエステル交換により得

た。加水分解後、フェナシルブロミド<sup>45)</sup>を用いて処理した (Fig. 37)。このエステル交換は、後述するように TS-B-V の合成において重要である。Z 基の除去は、フラグメント [1] の場合と同じ方法で行なった。



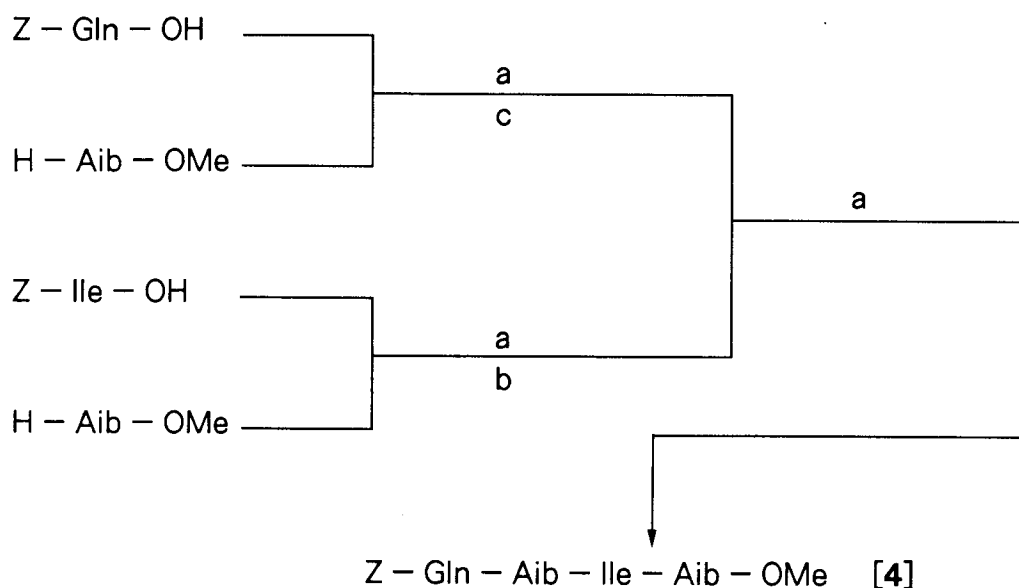
**Figure 36.** Synthtic Scheme for the Protected Tetrapeptide [2] (Positions 14–17).  
a : DCC – HOBT, b : H<sub>2</sub> /Pd – C.



**Figure 37.** Synthtic Scheme for the Protected Tripeptide [3] (Positions 11–13).  
a : DCC – HOBT, b : H<sub>2</sub> /Pd – C, c : 1N NaOH.

#### 6-2-4 保護 trichosporin-B-V (7-10位)、Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OMe [4] の合成

フラグメント [4] は、Fig. 38 に示すように 2 つのジペプチドを縮合することにより得た。予期に反し、この保護テトラペプチドは、かなりの親水性を示した。<sup>43a)</sup> 一方、アルカリ加水分解によって得られた対応する酸成分は、親水性を示さなかった。



**Figure 38.** Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide [4] (Positions 7-10).  
a : DCC-HOBt, b :  $H_2/Pd-C$ , c : 1N NaOH.

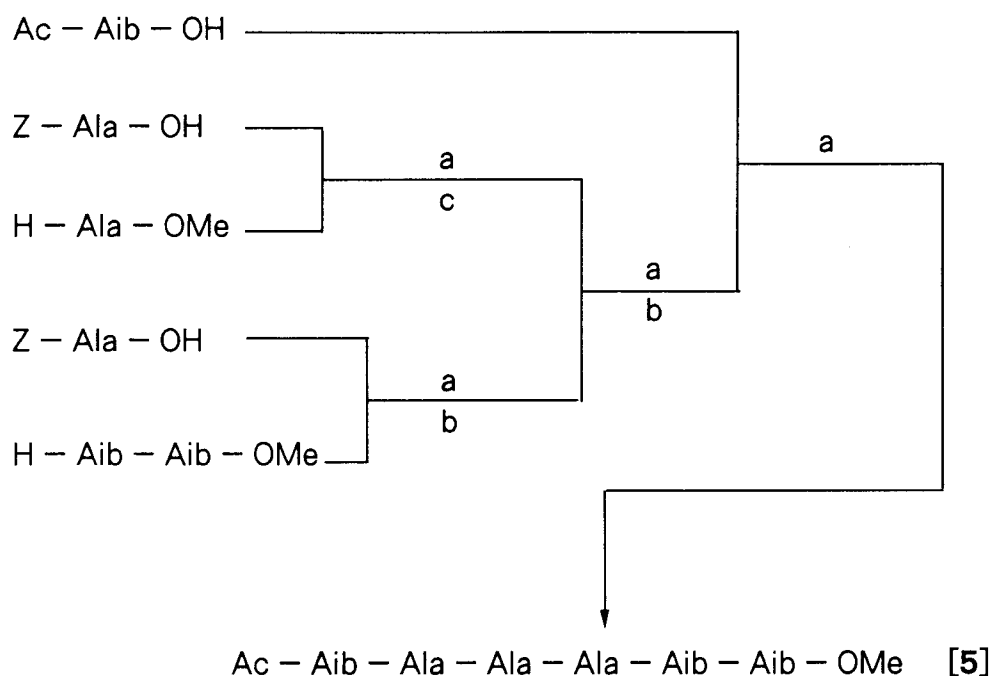
#### 6-2-5 保護 trichosporin-B-V (1-6位)、Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-OMe [5] の合成

フラグメント [5] は、Fig. 39 に示すルートに従って合成した。Z-Ala-Ala-OH (2-3位) と H-Ala-Aib-Aib-OMe (4-6位) との縮合過程は、Ala でのラセミ化の可能性を有するが、得られた生成物はその<sup>1</sup>H-と<sup>13</sup>C-NMR から単一であった。Ac-Aib-OH とアミン成分 (2-5位) をカップリングさせて得られたヘキサペプチドとその対応する酸成分は、いずれも水に易溶であった。



## 6-2-6 フラグメント縮合

このようにして得られた5つのフラグメントを、Fig. 34に示したルートに従って順次縮合した。フラグメント縮合は、すべてDMF中、室温下DCC-HOBt法により行なった。フラグメント[1]から得られたアミン成分とフラグメント[2]から得られた酸成分を縮合し、C-末端ヘキサペプチド(14-20位)を得た。生成物はセファデックス LH-20クロマトグラフィーで精製後、MeOH-etherから再結晶した。アミノ保護基、Z基を接触還元で除去し脱保護ヘキサペプチドを得た。



**Figure 39.** Synthtic Scheme for the N-Terminal Hexapeptide [5] (Positions 1- 6).  
a : DCC - HOBt, b : H<sub>2</sub> /Pd - C, c : 1N NaOH.

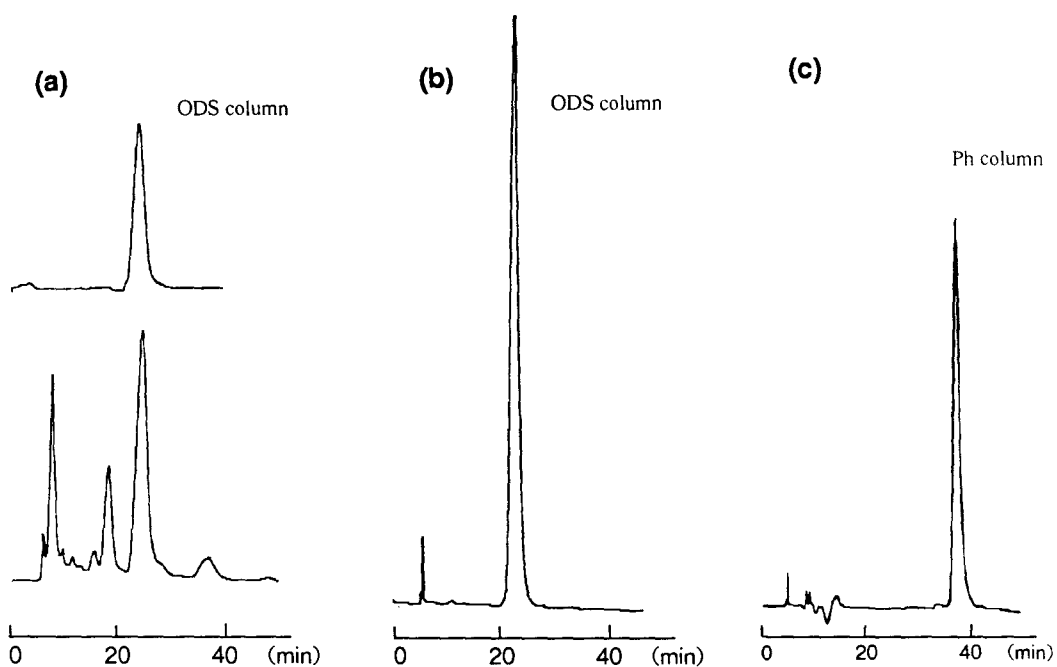
TS-B-Vの分子の中間に位置しているヘキサペプチド(7-13位)を、フラグメント[3](11-13位)とフラグメント[4](7-10位)から誘導したペプチドを縮合して得た。シリカゲルクロマトグラフィーで精製後、フェナシル基を酢酸中Zn<sup>45)</sup>を用いて除去し、十分に満足する収率(84%)で単一の対応する酸成分に導いた。当初、対応するヘキサペプチドメチルエステル体を合成し、酸成分に導

こうとしたが、アルカリ加水分解でTLC上多くのスポットを示した。

ヘキサペプチドの酸成分(7-13位)を、C-末端アミン成分(14-20位)と縮合させたが、その収率は低かった。これは、おそらく立体障害のために酸成分の活性化が十分に行なわれなかったものと考えられる。得られたテトラデカペプチド(7-20位)は、酸に対し不安定な Aib-Pro 結合を有するため、精製の段階での酸の使用は避けた。生成物は、セファデックス LH-20 クロマトグラフィーで精製後、シリカゲルクロマトグラフィーに付した。Z 基を常法により除去し、TLC 上単一の脱保護ペプチド(7-20位)を得た。合成 trichosporin-B-V を、N-末端ヘキサペプチドの酸成分(1-6位)と上記アミン成分(7-20位)を縮合して得た。粗 TS-B-V をセファデックス LH-20 クロマトグラフィーに付し、TLC 上、目的化合物を含むフラクションを合わせ減圧下濃縮した。その残渣を、逆相分取カラム(ODS)で精製した。精製合成 TS-B-V は、ODS とフェニルの2種類の異なる逆相カラムを用いて HPLC クロマトグラム上単一ピークを示し、その保持時間は、天然物のそれと全く同じであった (Fig. 40)。

### 第3節 合成 trichosporin-B-V と天然物との比較

合成 TS-B-V は FAB MS と  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR から同定された。Fig. 41 に、合成 TS-B-V の FAB mass スペクトルを示す。フラグメンテーションパターンは、両者同一である。また、合成 TS-B-V の  $^1\text{H}$ -と  $^{13}\text{C}$ -NMR シグナルは、天然物のそれとよい一致を示した。スペクトルの一部を、Fig. 42 と 43 に示す。線形のわずかな差は、シグナルのケミカルシフトが、サンプル濃度と測定温度に影響されるためであると考えられる。物理化学定数(融点、旋光度)もまた、天然の TS-B-V のそれとよい一致を示した。



**Figure 40.** Analytical HPLC Chromatograms of the Synthetic Trichosporin- B- V.

(a) The natural Trichosporin- B- V (upper) and the crude sample after gel- filtration (lower).

(b) and (c) The purified sample.

The details are described in the experimental section.

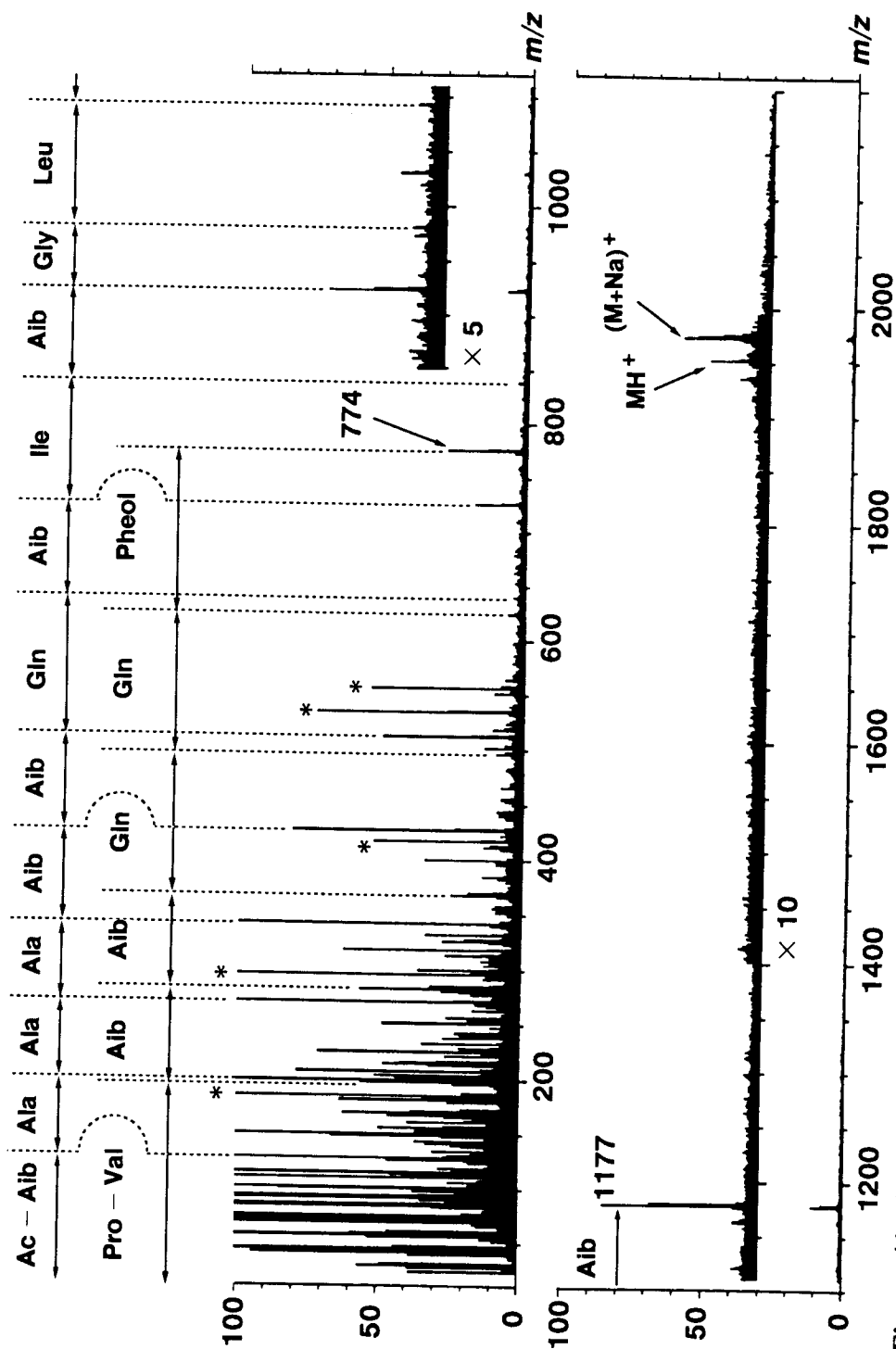
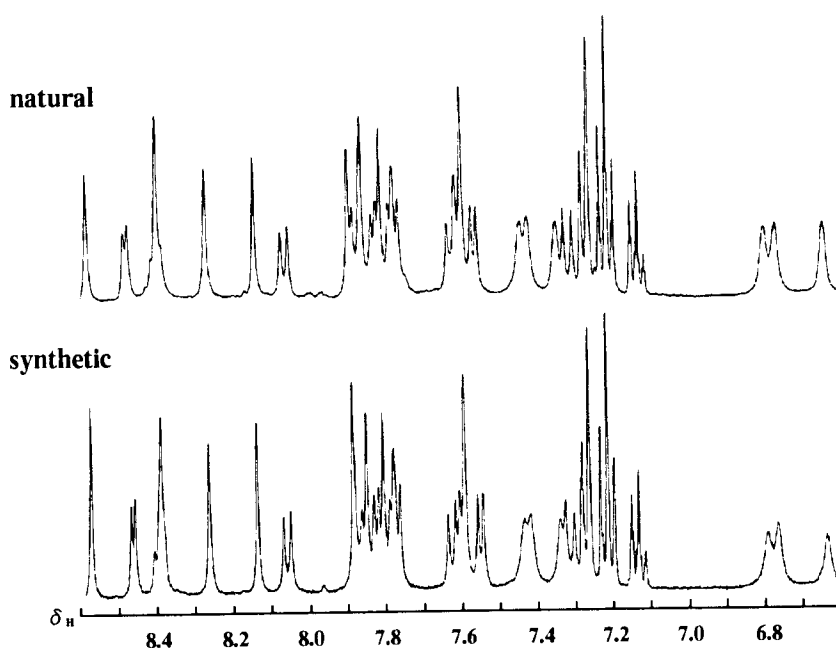
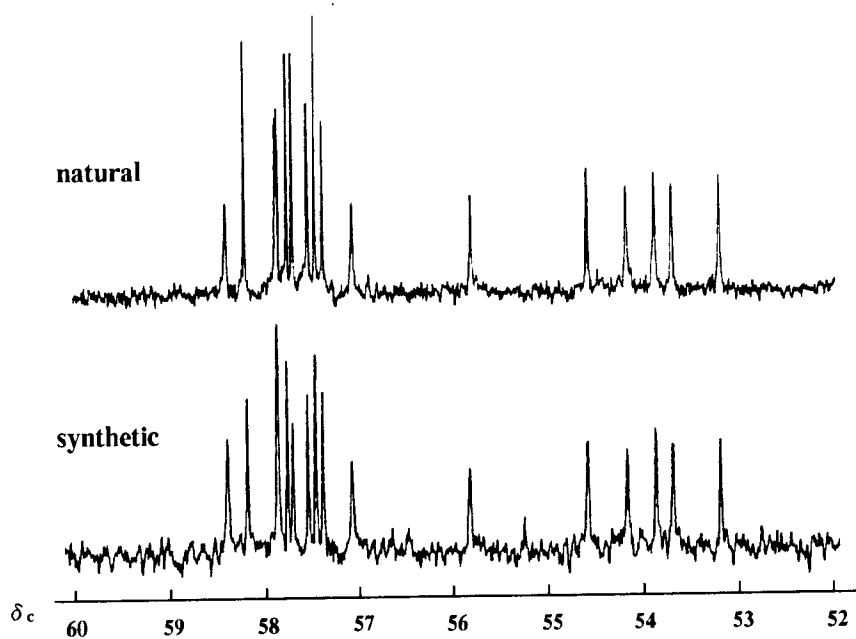


Figure 41. Positive-ion FAB Mass Spectrum of the Synthetic Trichosporin - B - V.



**Figure 42.** Part of the  $^1\text{H}$ - NMR Spectrum of the Synthetic Trichosporin- B- V Measured in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at  $26^\circ\text{C}$  (4.8 mM).



**Figure 43.** Part of the  $^{13}\text{C}$ - NMR Spectrum of the Synthetic Trichosporin- B- V Measured in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at  $26^\circ\text{C}$  (4.8 mM).

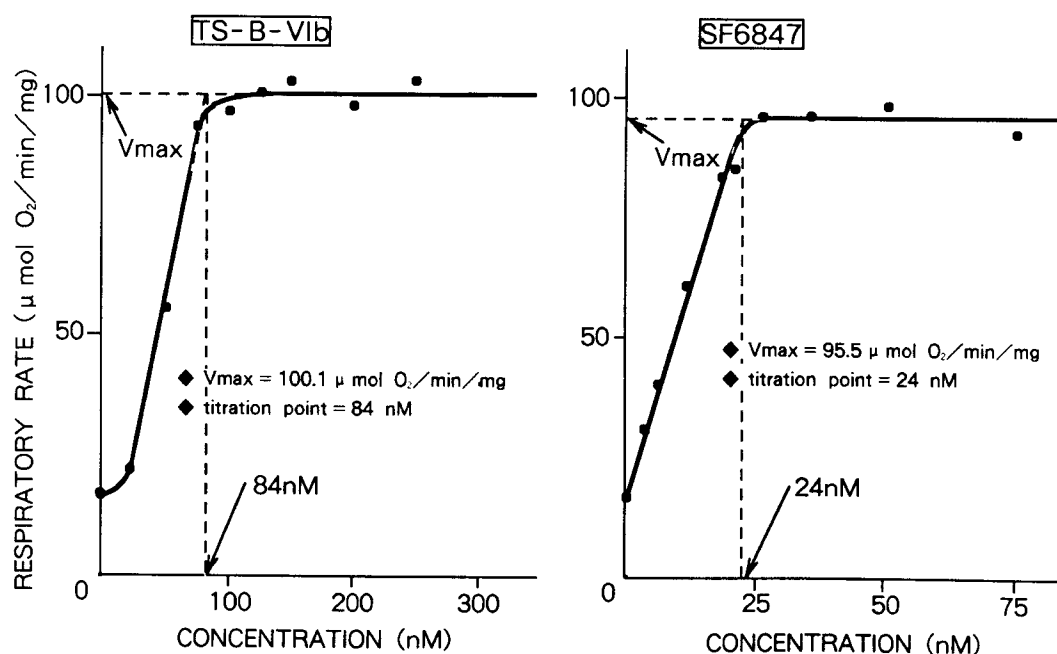
## 第7章 Trichosporin-B類の生物活性

### 第1節 Trichosporin-B類のミトコンドリアに対する作用

#### 7-1-1 ミトコンドリアに対する脱共役作用

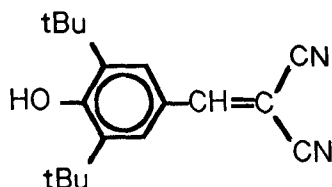
Hypelcin類および alamethicin は、ラット肝ミトコンドリアに対して脱共役作用<sup>2)</sup>を有する。TS-B類のそれらとの構造の類似性から、TS-B類もまた同様に脱共役作用を有することが予想された。

ラット肝ミトコンドリアに対してTS-B-VIbを作用させたところ、その呼吸を促進し脱共役活性を示した。既知で最強の脱共役剤であるSF6847の活性と比較したところ、用量-反応曲線においてTS-B-VIbの滴定点濃度は約84 nMで、SF6847 (24 nM) の約30%の脱共役活性を示した。(Fig. 44)。また、TS-B-VIbはゼロ濃度付近の非常に低い濃度において無反応の領域を示し、SF6847との活性特性の違いが示唆された。



**Figure 44.** Uncoupling Activity of Trichosporin-B-VIb and SF6847 against rat liver mitochondria.

SF6847



同様にして、他の TS-B 類についても脱共役活性を測定し、滴定点濃度を求めた (Table 11)。それを指標に脱共役活性の強さを検討したところ、明らかに構造と活性との間に相関が認められた (Table 6 を参照)。9 位のアミノ酸残基が活性強度に与える影響は、Ile > Leu > Val の順であり、17 位の残基においては Iva > Aib > Ala の順であった。また、3 位の残基の影響は、Aib > Ala > Ser の順であった。すなわち、アミノ酸残基の脂溶性が増すほどその活性は増大した。

一方、hypelcin-A 類 (混合物として用いた) の規定点濃度は 532 nM で、TS-B-1a よりもさらに活性が弱かった。

**Table 11.** Titration Points of Trichosporin- Bs.

	Concentration (nM)		Concentration (nM)
Ia	490	IVc	240
IIIa	263	IVd	267
IIIb	312	V	155
IIIc	261	VIa	106
IVb	168	VIb	84

### 7-1-2 脱共役活性の特性

次に、活性の最も高い TS-B-VIb を用いてその脱共役活性の特性を調べたところ、次に示す hypelcin 類と同様の特性を示した。

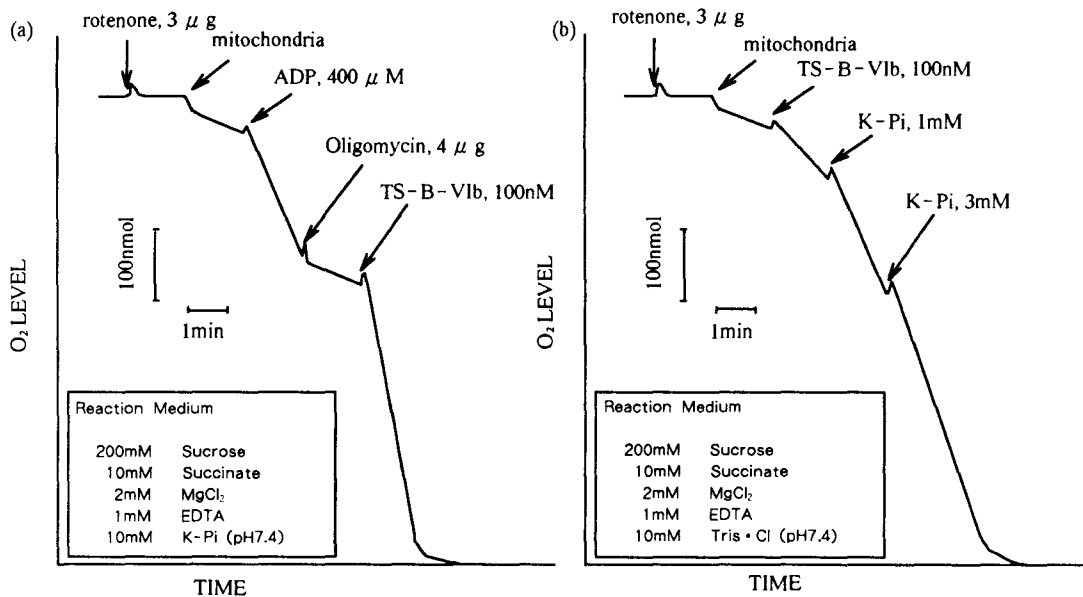
- ① TS-B-VIb は、ATPase の特異的阻害剤である oligomycin により抑制されたミトコンドリアの呼吸を開放した (Fig. 45 a)。
- ② 無機リン酸を含まない反応液中 TS-B-VIb を作用させ、無機リン酸の添

加効果を調べたところ、ミトコンドリアの呼吸が促進された (Fig. 45 b)。

③ 無機リン酸の膜透過を抑制する NEM (N-Ethyl Maleimide) を作用させると、その活性は抑制された。

④ 他の陰イオン ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ) は、活性を促進しなかった。

以上の結果から、TS-B 類の脱共役作用は hypelcin 類と同じ機構で発現することが示された。



**Figure 45.** Characteristics of the Uncoupling Activity of Trichosporin-B-VIb.

## 第2節 Trichosporin-B 類の副腎髄質細胞に対する作用

副腎髄質細胞におけるカテコールアミン放出作用は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  がイオンチャンネルを透過して流入することと深く関係している。脱共役作用が、ミトコンドリア膜におけるイオンチャンネルが形成により発現すると推定されること、ならびに alamethicin が SUV (Small Unilamellar Vesicle) 膜において  $\text{Ca}^{2+}$  を選択的に透過<sup>2b)</sup>させることから、TS-B 類は副腎髄質細胞に対して何らかの作用を示すことが予想された。



副腎髄質細胞は生理的にアセチルコリンの刺激を受け、カテコールアミン(=ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン)を分泌する。このカテコールアミン分泌は、主に次のような機構であるといわれている。すなわち、

- 1) アセチルコリンが髄質細胞膜に存在するニコチンレセプターに結合
- 2) ナトリウムチャンネルが開き細胞外  $\text{Na}^+$  の細胞内への流入
- 3) 細胞膜の脱分極が生じて  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞外から細胞内への流入
- 4) カテコールアミンを含んだ顆粒の膜と細胞膜との融合
- 5) 開口分泌(エキソサイトーシス)によってカテコールアミンの細胞外へ放出

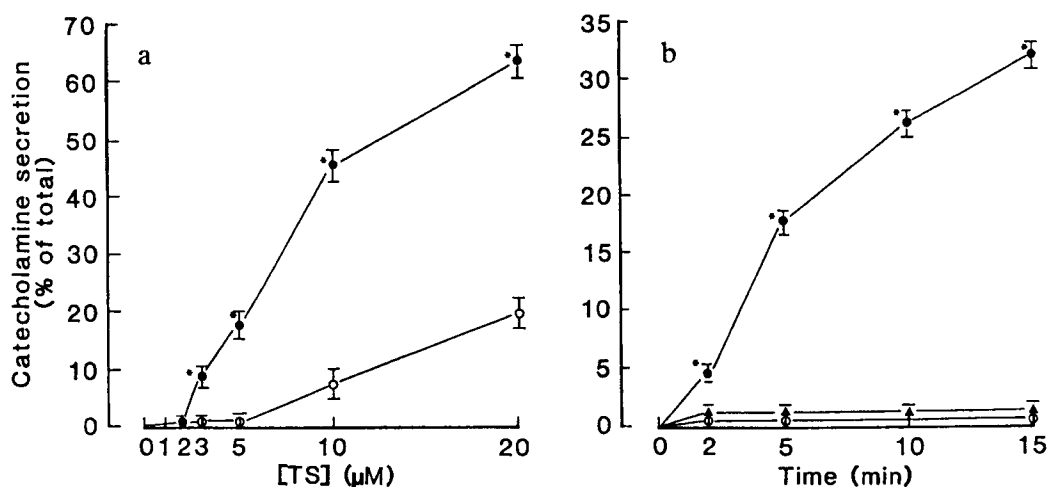
したがって副腎髄質細胞は交感神経系におけるカテコールアミン遊離機構を研究する上でのよいモデルとなる。

#### 7-2-1 TS-B類によるカテコールアミンの分泌

実験には牛副腎髄質をコラゲネースで処理、分離細胞とした後、4日間イーグル液で培養した副腎髄質細胞を使用した。TS-B-III(IIIa~dの混合物)と髄質細胞を5分間、37℃でインキュベーションすると、その濃度に依存して細胞からカテコールアミン分泌が生じた(Fig. 46 a)。3  $\mu\text{M}$  TS-B-IIIからカテコールアミン分泌が観察され、5  $\mu\text{M}$  で全細胞内カテコールアミンの約18%の分泌をおこした。これは20-30  $\mu\text{M}$ 濃度のアセチルコリン刺激によるカテコールアミン分泌量に相当する。さらに、20  $\mu\text{M}$  TS-B-IIIは60%以上のを分泌させた。反応液から  $\text{Ca}^{2+}$  を除去すると、低濃度(3-5  $\mu\text{M}$ )のTSによるカテコールアミン分泌は完全に消失した。一方、高濃度TS-B-III(10-20  $\mu\text{M}$ )によるカテコールアミン分泌はかなり抑制されたが、一部認められた。Fig. 46 (b)は5  $\mu\text{M}$  TS-B-IIIによるカテコールアミン分泌のtime courseを示している。反応2分後にカテコールアミン分泌が認められ、それは反応時間に依存して増加した。

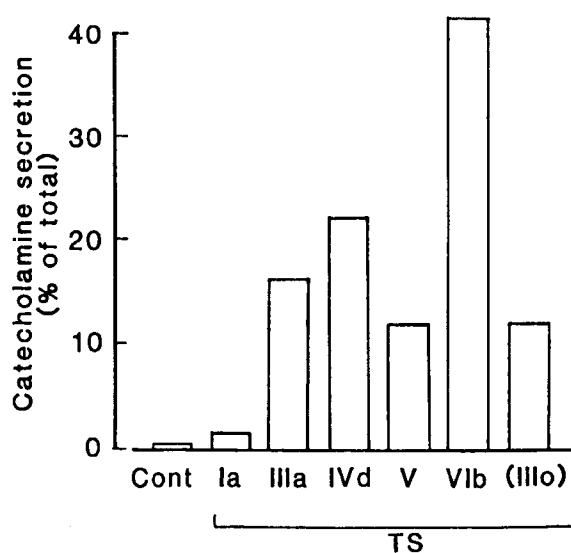
カテコールアミン放出効果は他のTS-B類においても同様に認められた(Fig. 47)。しかしカテコールアミン分泌作用の効力には、各TSによって大きな差があり、5  $\mu\text{M}$ の濃度においては、TS-B-Iaの活性が最も弱く2%のカテコールアミン分泌作用しかなかった。一方、VIbは40%のカテコールアミンを分泌させ、最も強い活性を持っていた。また、TS-B-Vは18%であり、このようにその分

子のアミノ酸組成と配列、つまりは分子の極性により活性が大きく左右された。



**Figure 46.** Effects of Trichosporin- B- III on Catecholamine Secretion from Cultured Bovine Adrenal Medullary Cells.

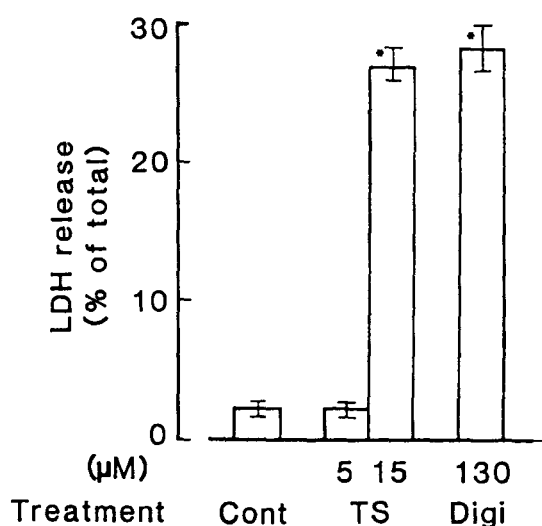
- (a) The adrenal medullary cells were incubated for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with various concentrations of TS- B- III in 2.6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ - containing (●) or  $\text{Ca}^{2+}$ - free medium (○).
- (b) The cells were incubated with (●) or without 5  $\mu\text{M}$  TS- B- III(○) in 2.6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ - containing or with 5  $\mu\text{M}$  TS- B- III in  $\text{Ca}^{2+}$ - free medium (▲) for times indicated. The amount of catecholamines released from the cells was expressed as a percentage of total cellular catecholamines.



**Figure 47.** Effects of TS - Bs on Catecholamin Secretion from the Cells.

### 7-2-2 乳酸脱水素酵素の遊離

乳酸脱水素酵素 (LDH) は細胞内の指標酵素である。髄質細胞を 10 分間インキュベーションすると、細胞内 total LDH 活性の約 2% が細胞外メディウム (反応液) に認められた (Fig. 48)。同様に、5  $\mu$  M TS-B-III を加えて細胞をインキュベーションしたが、LDH 遊離には変化が認められなかった。一方、15  $\mu$  M TS-B-III は細胞から約 28% の LDH を遊離させ、これは生体膜を破壊する 130  $\mu$  M ジギトニンを用いたときの LDH 遊離量にほぼ等しかった。以上の結果は、低濃度 TS-B-III (3-5  $\mu$  M) のカテコールアミン分泌作用が外液  $\text{Ca}^{2+}$  に依存していること、それに対して高濃度 TS-B-III (10-20  $\mu$  M) のカテコールアミン分泌作用には  $\text{Ca}^{2+}$ -依存性と  $\text{Ca}^{2+}$ -非依存性の 2 つの機構があることを示している。また、 $\text{Ca}^{2+}$ -非依存性分泌は TS によって障害を受けた細胞膜や顆粒膜からの受動的な漏出によることを示唆している。



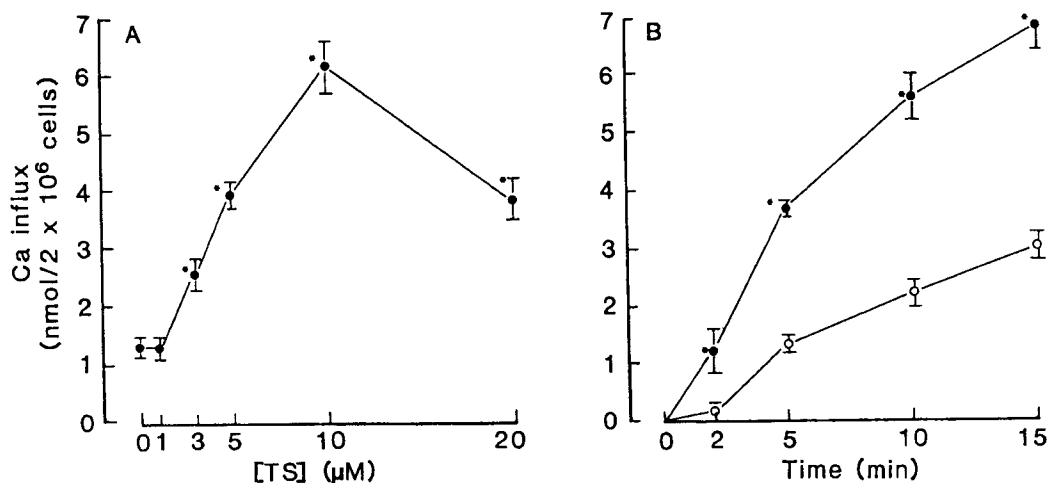
**Figure 48.** Effects of TS - B- III and Digitonin (Digi) on Lactate Dehydrogenase (LDH) Release from the Cells.

The cells were incubated for 10 min at 37°C with or without TS-B-III (5 and 15  $\mu$  M) or digitonin (130  $\mu$  M) in the medium. The lactate dehydrogenase activity was expressed as a percentage of total cell content.

### 7-2-3 $\text{Ca}^{2+}$ の流入

細胞からカテコールアミンが分泌されるためには、 $\text{Ca}^{2+}$  の副腎髄質細胞内への流入が不可欠である。TSによる  $\text{Ca}^{2+}$ -依存性カテコールアミン分泌の作用機構を調べるため、細胞内への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の取り込み実験を行った。Fig. 49 (a)に示すように、5  $\mu\text{M}$  TS-B-IIIは細胞内への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の取り込みを濃度依存性に増加させた。TS-B-IIIによる  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への取り込みは3  $\mu\text{M}$  から観察され、10  $\mu\text{M}$  まで増加した。20  $\mu\text{M}$  のTS-B-IIIはむしろ10  $\mu\text{M}$  による効果よりも減弱した。これは細胞内に一度取り込まれた  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の流出によると考えられる。この様にTS-B-IIIによる  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の取り込みの用量-反応曲線とカテコールアミン分泌の用量-反応曲線は、10  $\mu\text{M}$  までよく一致していた。また、5  $\mu\text{M}$  TS-B-IIIによる  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入増加の time course (Fig. 49 (b)) もTS-B-IIIのカテコールアミン分泌増加の time course によく一致した。

これらの結果から、TS-B類は細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を促進させ、その結果カテコールアミン分泌をおこしていると考えられる。TS-B類によるカテコールアミン分泌は反応液中の  $\text{Na}^+$  の除去によっても認められ、また電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤のテトロドトキシンによって何ら影響されなかった。従って、TS-B類は  $\text{Na}^+$  に非依存的に直接  $\text{Ca}^{2+}$  を副腎髄質細胞内へ流入させるものと推測された。



**Figure 49.** Effects of TS - B- III on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  Influx into the Cells.

(A) The cells were incubated for 5 min at 37°C with various concentrations of TS-B- III in the medium containing  $^{45}\text{CaCl}_2$ .

(B) The cells were incubated with (●) or without 5 μM TS-B- III (○) in the medium containing  $^{45}\text{CaCl}_2$  for the times indicated.

The  $\text{Ca}^{2+}$  influx was expressed as nanomoles of Ca per 2 x 10<sup>6</sup> cells.

## 第8章 要約および結語

### 1) 単離と構造決定

木材腐朽菌 *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) Rifai TMI 60146の培養液より新規ペプチド trichosporin-B類を11種単離し、その1次構造をFAB MS、FAB MS/MS、NMRにより決定した。Trichosporin-B類は下式に示す基本構造を有し、その3位、5位、9位および17位においてアミノ酸残基が置換された極めて類似した化合物群であることが明らかにされた。

Ac-Aib-Ala-W-Ala-X-Aib-Gln-Aib-Y-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Z-Gln-Gln-Pheol

W = Ala, Aib, Ser, X = Ala, Aib, Y = Ile, Leu, Val, Z = Ala, Aib, Iva

### 2) Trichosporin-B-Vの2次構造

Trichosporin-B-Vは、MeOH中-5℃においては $3_{10}$ -helix構造のfirst turnを有し、27℃においては $3_{10}$ -helix構造と $\alpha$ -helix構造が共に同時に存在するfirst turnを持つことを明らかにした。また、first turn以降はPro付近における折れ曲がり構造を有した $\alpha$ -helix構造を取ることを明らかにした。

### 3) Trichosporin-B-Vの合成

Trichosporin-B-Vはフラグメント縮合法により合成された。それは天然物と完全な一致を示し、推定構造の正しいことを証明した。

### 4) Trichosporin-B類の生物活性

Trichosporin-B類は、ラット肝ミトコンドリアに対し脱共役作用を、副腎髄質細胞に対しカテコールアミン分泌作用を示すことを明らかにした。また、その活性はtrichosporin-B分子の脂溶性に依存していることを推定した。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始ご懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師京都大学藤多哲朗教授に心から感謝の意を表します。

また、種々有益な御指導、御助言を賜りました日本たばこ産業医薬研究所上里新一博士、神戸学院大学新宮徹朗教授ならびに徳島大学高石喜久助教授に深く感謝いたします。

また、カテコールアミン放出活性について御指導いただいた岩手医科大学立川英一助教授ならびに NMR に関して御助言をいただいた本学黒田義弘助教授に深く感謝いたします。

さらに、FAB MS の測定をしていただいた近畿大学理工学部森田全律氏、日本電子(株)田中一夫博士、FAB MS/MS の測定をしていただいた藤沢薬品工業(株)藤岡守氏、Finnigan MAT instruments, Inc. Patrick J. Rudewicz 博士ならびに金井みち子女史に深く感謝いたします。

また、元素分析と質量分析の労をとられた京都大学有機微量元素分析総合施設と京都大学薬学部質量分析室の各氏ならびに秋本直茂博士に感謝いたします。

さらに、本研究の実験に協力していただいた山賀(高橋)佳子学士、奥田真弘修士、吉松信也学士、実方正樹学士ならびに薬用植物化学講座の諸氏に合わせて感謝いたします。

# 実 験 の 部



## 実験の部

融点はすべて柳本微量融点測定器で測定し未補正值である。旋光度は JASCO DIP-181 digital polarimeter、CD は JASCO J-600 spectropolarimeter を用いて測定した。HPLC には、Shimadzu LC-6A system を使用した。

FAB MS は JEOL JMX-HX 100 ならびに Finnigan MAT TSQ 70 を用いて、FAB MS/MS は Finnigan MAT TSQ 70 を用いて測定した。FAB によるイオン化は 8 keV のキセノンガスで行い、また、コリジョンには 40 eV のエネルギーをもったキセノンあるいはアルゴンガスを使用した。マトリックスとして、glycerol-thioglycerol (1:1) あるいは dithiothreitol-dithioerythritol (3:1) を使用した。

NMR の測定には、JEOL JNM-FX 200 (200 MHz)、Bruker AC-300 (300 MHz)、AM-400 (400 MHz) ならびに AM-600 (600 MHz) スペクトロメーターを使用した。内部標準として、TMS (tetramethylsilane) を用いた。以下に 300 MHz 以上の NMR の測定条件について示す。<sup>1</sup>H-NMR に関しては 600MHz 磁場における条件を、<sup>13</sup>C-NMR に関しては 100MHz 磁場での条件を示している (他のメガ数の磁場においても掃引幅が変わるだけで残りの条件は同じである)。

### ① 1次元 NMR スペクトル

1次元 <sup>1</sup>H-NMR スペクトルは、通常 11900 Hz の掃引幅、64K データポイントを用いて記録した。溶媒に CD<sub>3</sub>OH を用いて測定する場合、溶媒由来の巨大な -OH ピークは、2.4 秒の待ち時間の間に前もって飽和する (presaturation) ことにより取り除いた。<sup>13</sup>C-NMR スペクトル (100MHz の場合) は、通常 20800 Hz の掃引幅、64K データポイントを用いて記録した。

### ② 2次元 NMR スペクトル

2次元 NMR はすべて Bruker 標準自動プログラムを用いて測定した。CD<sub>3</sub>OH 中における COSY、RCT の測定には 2.5 秒の待ち時間の間に溶媒由来の -OH のピークを照射し、一方 NOESY の測定には展開時間ならびに検出時間以外のすべての間 -OH ピークを照射した。Table 12 に 2次元 NMR 測定パラメーターを示す。

薄層クロマトグラフィー (TLC) には Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck) を用い、以下の溶媒系 (v/v) で展開した。

$Rf_1$  CHCl<sub>3</sub>-MeOH (95:5),  $Rf_2$  CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1),  $Rf_3$  CHCl<sub>3</sub>-MeOH (8:2),  $Rf_4$  CHCl<sub>3</sub>-MeOH (7:3),  $Rf_5$  CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (6:5:2)。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーとゲル濾過カラムクロマトグラフィーには、それぞれ Silica gel 60 (70-230 mesh, Merck) と Sephadex LH-20 (Pharmacia) を用いた。

イオン交換樹脂は、Amberlite IR - 120B、IRA - 400、XAD - 2 (Organo) を使用した。  
 反応後の溶媒の乾燥には、特に記載しない限り無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いた。

**Table 12.** Summary of Experimental Parameters\* Used in the Two-Dimensional NMR Experiments.

parameter	COSY	RCT	HOHAHA	NOESY	<sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H- COLOC	HMBC
sweep width in F <sub>2</sub> (Hz)	6024	6024	6172	6330	17860	3496
sweep width in F <sub>1</sub> (Hz)	3012	3012	3086	3165	3260	8620
matrix size (F <sub>1</sub> × F <sub>2</sub> )	512 × 2K	512 × 2K	512 × 2K	512 × 2K	256 × 8K	1K × 2K
relaxation delay (s)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.3	2.5
other delay (ms)					(80, 40) (120, 60)	
mixing time (ms)		34	50	300		
window functions (F <sub>1</sub> / F <sub>2</sub> )	S/S	S/S	S/S	S/S	S/G	S/S
shifts of window functions in fraction of $\pi$			2/2	2/2	36	10/16

\* S and G stand for sine bell and gaussian window function, respectively. <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H- COSY has the same parameters except for other delay time.

## 第3章に関する実験

### ① Trichosporin - B 類の逆相分取 HPLC

Fig. 1 に示した手順で得た TS の画分 9.1 g のうち 3.0 g を逆相 (ODS) 分取 HPLC に付し、I~II (1.15 g)、III (0.68 g)、IV (0.17 g)、V (0.35 g) ならびに VI (0.11 g) を得た。

#### 逆相 (ODS) 分取 HPLC 条件

移動相 : 85 % MeOH - 15 % H<sub>2</sub>O

流速 : 5 ml / min

検出 : UV (220nm)

カラム : Nacalai Cosmosil 5C<sub>18</sub> (20 mm i. d. × 250 mm)

カラム温度: 40 °C

さらに、I~II の画分については、約 0.2 g を、V 以外の他の画分については全量を逆相 (フェニル) 分取 HPLC に付し、それを繰り返すことにより純粋な TS-B-Ia (19.2 mg)、IIIa (55.8 mg)、IIIb (22.9 mg)、IIIc (13.9 mg)、IIId (47.5 mg)、IVb (9.2 mg)、IVc (9.9 mg)、IVd (10.3 mg)、VIa (13.5 mg) ならびに VIb (32.4 mg) を得た。

#### 逆相 (5Ph) 分取 HPLC 条件

検出とカラム温度は上記と同一、カラムは Nacalai Cosmosil 5Ph (20 mm i. d. × 250 mm) を用いた。

	移動相	流速
Ia	85 % MeOH - 15 % H <sub>2</sub> O	3.0 ml / min
IIIa - d	83 % MeOH - 17 % H <sub>2</sub> O	2.5 ml / min
IVb - d	85 % MeOH - 15 % H <sub>2</sub> O	2.5 ml / min
VIa - b	80 % MeOH - 20 % H <sub>2</sub> O	9.0 ml / min

### ② 酸完全加水分解

ペプチドの酸完全加水分解は試料を (約 0.5 mg) を 6 N HCl、封管中、110 °C 24 時間加熱する条件下で反応した。

### ③ 構成アミノ酸および Pheol の絶対配置<sup>46)</sup>

酸完全加水分解 (約 0.5 mg) を 5 ml の無水 MeOH - SOCl<sub>2</sub> (10 : 1) 中で 3 時間還流後、反応液を減圧濃縮した。残渣を 3,5 - dinitrobenzoyl chloride (約 1 mg) とトリエチルアミン (1 滴) を含む EtOAc 溶液中で 24 時間攪拌、EtOAc 層を 1N HCl、5%NaHCO<sub>3</sub>、飽和食塩水で順次洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させ濃縮し HPLC サンプルとした。標品は、各構成アミノ酸および Pheol からそれぞれ上記と同条件で合成した。HPLC

による分析条件は下記の通りで、結果は Fig. 5 に示した。なお Pheol は、サンプル注入後 85 分後に溶媒比を A:90%、B:10% に変更すると、加水分解産物誘導体は 99.22 min の保持時間で、標品は 100.47 min の保持時間で溶出した。

分析 HPLC 条件 (グラジエントモード)

移動相 : A = n - hexane, B = dichlorethane - ethanol (5: 1, v/v)

流速 : 0.8 ml/min (A = 96%, B = 4%)

検出 : UV (254 nm)

カラム : Sumipax OA - 4100; 4 mm i. d. × 250 mm

カラム温度 : 35 °C

④ L, DL - Pheol の合成<sup>47)</sup>

例として、L - Pheol の合成を示す。DL - Pheol は、それと同様にして合成した。HCl・L - Phe - OMe (10 g, 46.37 mmol) の 50 % EtOH 溶液 (100 ml) に、氷冷下同じ溶媒に溶かした 4 モル等量の NaBH<sub>4</sub> を加えた。反応液を 5 時間還流後、濃縮乾固した。残渣に水を加えて EtOAc で抽出、EtOAc 層を飽和食塩水で洗浄した後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させ濃縮した。生成物は、ベンゼンより再結晶した。

収量 5.65 g (80 %). mp 91.5 ~ 93 (文献値 94 ~ 95).  $[\alpha]_D^{26} - 19.4^\circ$  (c = 1.00, MeOH) (文献値  $[\alpha]_D^{25} - 27.06^\circ$  (c = 0.32, MeOH),  $[\alpha]_D^{24} - 23.3^\circ$  (c = 2.01, MeOH)). Amal. Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>: C, 71.49; H, 8.67; N, 9.26. Found: C, 71.23; H, 8.69; N, 9.26.

## 第4章に関する実験

TS-B類の  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR シグナルの帰属の結果を以下 Table 13 ~ 19 に示す。Table 19 は、第7章第2節の Fig. 47 に示したカテコールアミン分泌活性を試験した TS-B類の 600 MHz 磁場における NH 化学シフトならびに  $^3J_{\text{NH}-\alpha\text{H}}$  をまとめている。それらの値からは、TS-B-1a、IIIa、IVd ならびに VIb 類の 2 次構造は TS-B-V のそれとよく似ていることが示唆された。

**Table 13.** Proton Chemical Shifts <sup>a</sup> and <sup>3</sup>J<sub>NH-CαH</sub> Values <sup>b</sup> of Trichisporin – B – V in CD<sub>3</sub>OH at 27 °C (10 mM, 600 MHz).

Residue	δ <sub>H</sub>						<sup>3</sup> J <sub>NH-CαH</sub> (Hz)
	NH	α	β <sup>c</sup>	γ	δ	others <sup>d</sup>	
N – Ac		2.049					
Aib <sup>1</sup>	8.564		1.456				
Ala <sup>2</sup>	8.445	4.091	1.474				4.2
Ala <sup>3</sup>	7.800	4.126	1.48				6.5
Ala <sup>4</sup>	7.561	4.130	1.49				6.0
Aib <sup>5</sup>	7.886		1.531				
Aib <sup>6</sup>	7.851		1.579				
Gln <sup>7</sup>	7.83	3.881	2.18, 2.25	2.38, 2.552		7.448, 6.750 ( ε )	4.7
Aib <sup>8</sup>	8.135		1.589				
Ile <sup>9</sup>	7.596	3.74	2.10	1.36, 1.76	0.868	0.962( γ <sup>2</sup> )	6.1
Aib <sup>10</sup>	8.261		1.568				
Gly <sup>11</sup>	8.390	3.685, 3.950					5.0
Leu <sup>12</sup>	8.062	4.455	1.63, 1.98	1.93	0.919, 0.942		7.7
Aib <sup>13</sup>	8.388		1.539, 1.623				
Pro <sup>14</sup>		4.400	1.83, 2.32	2.00, 2.08	3.75, 3.89		
Val <sup>15</sup>	7.637	3.77	2.35	0.982, 1.072			7.8
Aib <sup>16</sup>	7.606		1.545				
Aib <sup>17</sup>	7.805		1.553				
Gln <sup>18</sup>	7.776	4.035	2.26	2.448, 2.619 2.6192.6192.2.6			5.6
Gln <sup>19</sup>	7.875	4.18	2.01, 2.06	2.31, 2.34			7.5
Pheol <sup>20</sup>	7.303	4.17	2.729, 2.951			3.622 (CH <sub>2</sub> – O) 7.281 (ortho), 7.233(meta), 7.154 (para)	9.2

<sup>a</sup> Chemical shifts obtained from two – dimensional spectra are expressed in Δ δ = ± 0.01.

<sup>b</sup> Some values were obtained from the J – resolved spectrum.

<sup>c</sup> Some Aib C<sup>β</sup> H<sub>3</sub> signals could not be assigned under the conditions described in the title.

<sup>d</sup> The signals arising from the Gln<sup>18, 19</sup> carboxamide protons are observed at δ<sub>H</sub> 6.623, 6.782, 7.356, 7.470.

**Table 14.** Carbon Chemical Shifts of Trichosporin – B – V in CD<sub>3</sub>OH at 27 °C (10 mM, 100 MHz).

Residue	$\delta_c$			
	$\alpha$	$\beta$	CO	others*
N – Ac	23.22		173.88	
Aib <sup>1</sup>	57.86	24.43, 26.73	178.84	
Ala <sup>2</sup>	53.65	16.89	177.67	
Ala <sup>3</sup>	53.14	16.45	177.46	
Ala <sup>4</sup>	53.90	16.70	177.09	
Aib <sup>5</sup>	57.55	23.22, 27.00	176.69	
Aib <sup>6</sup>	57.36	23.06, 27.38	178.84	
Gln <sup>7</sup>	58.35	27.68	176.06	32.95 ( $\gamma$ ), 177.61 ( $\delta$ )
Aib <sup>8</sup>	57.77	23.33, 27.57	178.54	
Ile <sup>9</sup>	63.59	36.00	175.60	27.38 ( $\gamma^1$ ), 15.58 ( $\gamma^2$ ), 10.21 ( $\delta$ )
Aib <sup>10</sup>	57.87	23.50, 27.50	179.30	
Gly <sup>11</sup>	45.14		173.16	
Leu <sup>12</sup>	54.13	41.67	176.00	25.67 ( $\gamma$ ), 21.48, 23.47 ( $\delta$ )
Aib <sup>13</sup>	58.20	23.83, 26.80	175.07	
Pro <sup>14</sup>	64.73	30.13	176.58	26.95 ( $\gamma$ ), 50.63 ( $\delta$ )
Val <sup>15</sup>	64.25	30.55	175.49	19.54, 20.24 ( $\gamma$ )
Aib <sup>16</sup>	57.70	23.50, 27.43	177.76	
Aib <sup>17</sup>	57.06	23.30, 27.00	178.96	
Gln <sup>18</sup>	57.01	28.00	175.60	33.22 ( $\gamma$ )
Gln <sup>19</sup>	55.75	28.14	174.12	32.82 ( $\gamma$ )
Pheol <sup>20</sup>	54.53	38.09		64.92 (CH <sub>2</sub> – O), 139.79 ( $\gamma$ ), 130.51 ( $\delta$ ), 129.26 ( $\epsilon$ ), 127.29 ( $\zeta$ )

\* The signals arising from the Gln<sup>18,19</sup> C <sup>$\delta$</sup>  carbons are observed at  $\delta_c$  177.44 and 177.94.

**Table 15.** Proton Chemical Shifts \* of Trichisporin – B – IIIa in CD<sub>3</sub>OH at 27 °C (60 mM, 400 MHz).

Residue	$\delta_H$					
	NH	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	others
N – Ac		2.043				
Aib <sup>1</sup>	8.563		1.47, 1.50			
Ala <sup>2</sup>	8.450	4.06	1.44			
Ala <sup>3</sup>	7.670	4.13	1.47			
Ala <sup>4</sup>	7.612	4.12	1.46			
Aib <sup>5</sup>	7.923		1.43, 1.51			
Aib <sup>6</sup>	7.849		1.46, 1.56			
Gln <sup>7</sup>	7.632	3.877	2.15, 2.26	2.37, 2.55		6.748 , 7.729( $\epsilon$ )
Aib <sup>8</sup>	8.116		1.52, 1.57			
Leu <sup>9</sup>	7.644	4.10	1.77	1.80	0.88, 0.94	
Aib <sup>10</sup>	8.179		1.52, 1.57			
Gly <sup>11</sup>	8.381	3.690, 3.951				
Leu <sup>12</sup>	8.104	4.429	1.632 1.92	1.88	0.89, 0.93	
Aib <sup>13</sup>	8.276		1.52 , 1.61			
Pro <sup>14</sup>		4.394	1.80, 2.31	1.97, 2.17	3.75 3.87	
Val <sup>15</sup>	7.638	3.73	2.33	0.981, 1.071		
Aib <sup>16</sup>	7.619		1.46, 1.53			
Aib <sup>17</sup>	7.807		1.53			
Gln <sup>18</sup>	7.777	4.03	2.24	2.44, 2.62		6.782 , 7.455( $\epsilon$ )
Gln <sup>19</sup>	7.874	4.16	2.02	2.18, 2.33		6.631, 7.345( $\epsilon$ )
Pheol <sup>20</sup>	7.302	4.16	2.729, 2.946			3.528 (CH <sub>2</sub> – O) 7.27 (ortho), 7.229(meta), 7.146 (para)

\* Chemical shifts obtained from two – dimensional spectra are expressed in  $\Delta \delta = \pm 0.01$ .



**Table 16.** Carbon Chemical Shifts of Trichosporin - B - IIIa in CD<sub>3</sub>OH at 27 °C (60 mM, 100 MHz).

Residue	$\delta_c$			
	$\alpha$	$\beta$	CO	others
N - Ac	23.24		173.65	
Aib <sup>1</sup>	57.30	24.24, 26.63	178.65	
Ala <sup>2</sup>	53.49	16.32	177.38	
Ala <sup>3</sup>	52.98	16.79	177.26	
Ala <sup>4</sup>	53.72	16.57	177.87	
Aib <sup>5</sup>	57.43	23.08, 26.68	176.63	
Aib <sup>6</sup>	57.30	24.31, 27.30	178.65	
Gln <sup>7</sup>	58.19	27.51	175.94	32.72 ( $\gamma$ ), 177.40 ( $\delta$ )
Aib <sup>8</sup>	57.62	23.53, 27.39	178.50	
Leu <sup>9</sup>	56.46	40.55	176.233	25.77 ( $\gamma$ ), 21.98, 22.75 ( $\delta$ )
Aib <sup>10</sup>	58.03	23.18, 26.61	179.03	
Gly <sup>11</sup>	44.99		172.85	
Leu <sup>12</sup>	53.92	41.42	175.76	25.58 ( $\gamma$ ), 21.46, 23.42 ( $\delta$ )
Aib <sup>13</sup>	58.19	23.69, 26.70	174.82	
Pro <sup>14</sup>	64.58	29.96	176.33	26.61 ( $\gamma$ ), 50.40 ( $\delta$ )
Val <sup>15</sup>	64.15	30.37	175.30	19.39, 20.14 ( $\gamma$ )
Aib <sup>16</sup>	57.53	23.32, 27.30	177.69	
Aib <sup>17</sup>	58.02	22.75, 27.30	178.71	
Gln <sup>18</sup>	56.66	27.65	175.39	33.06 ( $\gamma$ ), 177.69 ( $\delta$ )
Gln <sup>19</sup>	55.60	28.00	173.95	32.82 ( $\gamma$ ), 177.20 ( $\delta$ )
Pheol <sup>20</sup>	54.36	37.97		64.77 (CH <sub>2</sub> - O), 139.65 ( $\gamma$ ), 130.35 ( $\delta$ ), 129.10 ( $\epsilon$ ), 127.11 ( $\zeta$ )

**Table 17.** Proton Chemical Shifts \* of Trichisporin - B - VIb in CD<sub>3</sub>OH at 25 °C (30 mM, 400 MHz).

Residue	$\delta_H$					
	NH	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	others
N - Ac		2.040				
Aib <sup>1</sup>						
Ala <sup>2</sup>		4.08				
Ala <sup>3</sup>	7.762	4.12				
Ala <sup>4</sup>	7.600	4.11				
Aib <sup>5</sup>	7.909					
Aib <sup>6</sup>	7.887					
Gln <sup>7</sup>	7.838	3.87	2.15	2.37, 2.55		
Aib <sup>8</sup>	8.155					
Ile <sup>9</sup>	7.633	3.70	2.07	1.31, 1.76	0.865	0.957 ( $\gamma'$ )
Aib <sup>10</sup>	8.282					
Gly <sup>11</sup>	8.409	3.659, 3.935				
Leu <sup>12</sup>	8.079	4.447	1.97	1.94	0.922, 0.952	
Aib <sup>13</sup>	8.430					
Pro <sup>14</sup>		4.383	1.82, 2.32	2.02, 2.22	3.74 3.87	
Val <sup>15</sup>	7.617	3.74	2.34	0.980, 1.073		
Aib <sup>16</sup>	7.667					
Iva <sup>17</sup>	7.807		1.53			
Gln <sup>18</sup>	7.76	4.03	2.25	2.45, 2.64		
Gln <sup>19</sup>	7.78	4.16	2.03, 2.07	2.20, 2.34		
Pheol <sup>20</sup>	7.247	4.16	2.718, 2.948			3.61 (CH <sub>2</sub> - O) 7.270 (ortho), 7.223 (meta), 7.143 (para)

\* Chemical shifts obtained from two-dimensional spectra are expressed in  $\Delta \delta = \pm 0.01$ . The Aib<sup>1</sup> and Ala<sup>2</sup> NH signals are suppressed owing to the transfer of solvent saturation.

**Table 18.** Carbon Chemical Shifts of Trichosporin- B- VIb in CD<sub>3</sub>OH at 25 °C (30 mM, 100 MHz).

Residue	$\delta_c$			
	$\alpha$	$\beta$	CO	others
N- Ac	24.54		173.68	
Aib <sup>1</sup>			178.74	
Ala <sup>2</sup>	53.69	16.48	177.48	
Ala <sup>3</sup>	53.18	16.93	177.30	
Ala <sup>4</sup>	53.69	16.73	176.90	
Aib <sup>5</sup>			176.65	
Aib <sup>6</sup>			178.77	
Gln <sup>7</sup>	58.43		175.96	32.93 ( $\gamma$ )
Aib <sup>8</sup>	57.80		178.45	
Ile <sup>9</sup>	63.61	36.11	175.54	30.71 ( $\gamma^1$ ), 15.61 ( $\gamma^2$ ), 10.24 ( $\delta$ )
Aib <sup>10</sup>			179.07	
Gly <sup>11</sup>	44.19		173.02	
Leu <sup>12</sup>	54.22	41.76	176.05	25.75 ( $\gamma$ ), 23.46, 21.55 ( $\delta$ )
Aib <sup>13</sup>			174.68	
Pro <sup>14</sup>	64.81	30.14	176.37	26.98 ( $\gamma$ ), 50.59 ( $\delta$ )
Val <sup>15</sup>	64.38	30.64	175.43	20.29, 19.52( $\gamma$ )
Aib <sup>16</sup>			177.65	
Iva <sup>17</sup>	60.79		178.34	
Gln <sup>18</sup>	56.93	28.11	175.50	33.34 ( $\gamma$ )
Gln <sup>19</sup>	55.78	28.26	174.06	33.06 ( $\gamma$ )
Pheol <sup>20</sup>	54.48	38.08		64.93 (CH <sub>2</sub> - O), 139.81 ( $\gamma$ ), 130.44 ( $\delta$ ), 129.21 ( $\epsilon$ ), 127.21 ( $\zeta$ )

**Table 19.** Chemical Shifts<sup>a</sup> and <sup>3</sup>J<sub>NH-C $\alpha$ H</sub> Values<sup>b</sup> of Trichosporin-B- Ia, - IIIa, - IVd and - VIb in CD<sub>3</sub>OH at 27 °C (600 MHz).

Residue	Ia (5 mM)		IIIa (5 mM)		IVd (5mM)		VIb (5 mM)	
	$\delta_H$	(Hz)	$\delta_H$	(Hz)	$\delta_H$	(Hz)	$\delta_H$	(Hz)
1	8.634		8.556		8.560		8.559	
2	8.481	4.3	8.446	4.1	8.450	4.1	8.451	4.0
3	7.88	6.9	7.79	n. d.	7.782	6.5	7.784	6.6
4	7.686	5.5	7.558	5.8	7.555	5.9	7.558	5.9
5	7.875		7.891		7.885		7.884	
6	7.796		7.832		7.840		7.849	
7	7.850	5.1	7.84	n. d.	7.851	4.5	7.830	5.1
8	8.107		8.129		8.101		8.135	
9	7.63	5.8	7.636	6.0	7.536	5.8	7.596	5.8
10	8.174		8.188		8.208		8.260	
11	8.372	5.1	8.376	5.1	8.369	5.1	8.393	5.1
12	8.09	n. d.	8.100	7.9	8.075	7.8	8.064	7.7
13	8.263		8.274		8.423		8.403	
14	—	—	—	—	—	—	—	—
15	7.62	n. d.	7.613	7.8	7.605	7.7	7.603	7.6
16	7.600		7.599		7.675		7.681	
17	7.796		7.794		7.738		7.738	
18	7.784	6.2	7.79	n. d.	7.759	5.5	7.759	5.4
19	7.87	n. d.	7.870	7.3	7.869	7.6	7.870	7.3
20	7.31	9.0	7.309	9.2	7.25	9.0	7.26	9.0

<sup>a</sup> Chemical shifts obtained from two- dimensional spectra are expressed in  $\Delta \delta = \pm 0.01$ .

<sup>b</sup> Some values were obtained from the J- resolved spectra.

n. d. : Not determined.

## 第6章に関する実験

### 縮合反応

特に記載のないかぎり、縮合反応はDCC-HOBt法を用いて、室温下24-72時間行った。反応混合物は、DCU (dicyclohexylurea) および溶媒を除去したあと操作A法あるいはB法により精製した。

操作A法: EtOAcに易溶の保護ペプチドの場合、抽出液を1 N HCl、5% NaHCO<sub>3</sub>、飽和食塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ濃縮した。残渣を適当な溶媒より結晶あるいは沈殿とした。

操作B法: EtOAcに難溶の保護ペプチドの場合、粗生成物をMeOHに溶かし同じ溶媒を溶離液としてSephadex LH-20を用いてゲル濾過クロマトグラフィーに付した。目的物を含むフラクションを集め濃縮し、適当な溶媒より結晶あるいは沈殿とした。

### Z-ペプチドメチルエステルのアルカリ加水分解

特に記載のないかぎり、Z-ペプチドメチルエステルはMeOH中35℃以下で1 N NaOH (2-3等量)を用いて加水分解した。反応液を1 N HClで中和、MeOHを除いた後、1 N HClでpH 3としEtOAcで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ濃縮した。残渣は通常それ以上の精製をすることなく次の反応に用いた(操作C法)。

### 接触還元

特に記載のないかぎり、Z基 (benzyloxycarbonyl) は、10% Pd/Cを加え、H<sub>2</sub>ガスを導入し除去した。触媒を除去、濾液を濃縮して得た残渣は、通常それ以上の精製をすることなく次の反応に用いた(操作D法)。

### **Z-Gln-Pheol**

Z-Gln-OSu<sup>48)</sup> (5.89 g, 15.6 mmol) を Pheol (2.36 g, 1 当量) の DMF (60 ml) 溶液に加え、室温で36時間攪拌した。反応液を濃縮、残渣をエーテル中で碎きEtOAcで洗浄した。

収量 4.60 g (71%). mp 189-191℃.  $[\alpha]_D^{25} - 37.2^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$  0.40. EIMS m/z: 413 (M<sup>+</sup>), 263 (M<sup>+</sup> - Pheol). Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 63.90; H, 6.58; N, 10.16. Found: C, 63.83; H, 6.72; N, 10.15.

### **H-Gln-Pheol**

Z-Gln-Pheol (5.22 g, 12.6 mmol) を MeOH (150 ml) に溶かしD法に従って接触還元した。

収量 3.37 g (95%). mp 128-131℃.  $R_f$  0.41.

### **Z-Gln-Gln-Pheol [1]**

Z-Gln-OSu (2.70 g, 7.16 mmol) を H-Gln-Pheol (2.00 g, 1 当量) の DMF (90 ml) 溶液に加え、室温で 72 時間攪拌した。反応液を濃縮、残渣を EtOAc-MeOH (1:1) 中で碎き同じ溶媒で洗浄した。

収量 2.83 g (73%). mp 225–227 °C.  $R_f$  0.60. Anal. Calcd for  $C_{27}H_{35}N_5O_7$ : C, 59.88; H, 6.51; N, 12.93. Found: C, 59.82; H, 6.60; N, 12.65.

#### H-Gln-Gln-Pheol

Z-Gln-Gln-Pheol (2.81 g, 5.19 mmol) を AcOH (5 ml) に懸濁し、30% HBr / AcOH (20 ml) を加え、2 時間攪拌した。反応液に無水エーテルを加え、生じた沈殿物をすばやく濾過、無水エーテルで洗浄した。沈殿物を MeOH に溶かし Amberlite IRA-400 で処理した。

収量 1.76 g (83%).  $R_f$  0.39.

#### Z-Aib-Aib-OMe

Z-Aib-OH (22.53 g, 95.0 mmol)、HOBt (12.83 g, 1 当量)、DCC (19.60 g, 1 当量) を順次、TEA (triethylamine, 13.30 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Aib-OMe (14.59 g, 1 当量) の DMF (100 ml) 溶液に加え 24 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣は EtOAc から再結晶した。

収量 23.06 g (72%). mp 107–109 °C.  $R_f$  0.56. EIMS m/z: 336 ( $M^+$ ), 305 ( $M^+ - CO$ ). Anal. Calcd for  $C_{17}H_{24}N_2O_5$ : C, 60.70; H, 7.19; N, 8.33. Found: C, 60.58; H, 7.17; N, 8.33.

#### HCl·H-Aib-Aib-OMe

Z-Aib-Aib-OMe (3.00 g, 8.92 mmol) を、90% aq. MeOH (30 ml) に溶かし D 法に従って接触還元した。触媒を濾去、1N HCl を加え濃縮し塩酸塩とした。

収量 1.99 g (93%).  $R_f$  0.28.

#### Z-Val-Aib-Aib-OMe

Z-Val-OH (3.16 g, 12.6 mmol)、HOBt (1.70 g, 1 当量)、DCC (2.60 g, 1 当量) を順次、TEA (13.30 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Aib-Aib-OMe (3.00 g, 1 当量) の DMF (20 ml) 溶液に加え 48 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣は EtOAc-石油エーテルから再結晶した。

収量 3.35 g (61%). mp 100–102 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 3.2^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$  0.54. EIMS m/z: 435 ( $M^+$ ), 404 ( $M^+ - OCH_3$ ), 319 (404 – Aib), 291 (319 – CO). Anal. Calcd for  $C_{22}H_{33}N_3O_6$ : C, 60.67; H, 7.63; N, 9.64. Found: C, 60.59; H, 7.86; N, 9.64.

#### H-Val-Aib-Aib-OMe

Z-Val-Aib-Aib-OMe (2.50 g, 5.74 mmol) を、MeOH (10 ml) に溶かし D 法に従って接触還元しシロップ状生成物を得た。

収量 1.70 g (98%).  $R_f$  0.25.

#### Z-Pro-Val-Aib-Aib-OMe [2]

Z-Pro-OH (2.60 g, 10.4 mmol)、HOBt (1.41 g, 1 当量)、DCC (2.15 g, 1 当量) を順次、H-Val-

Aib-Aib-OMe (3.14 g, 1 当量) の DMF (24 ml) 溶液に加え 40 時間攪拌した。A 法に従って精製した残渣は TLC 上純粋でそれ以上の精製は行わなかった。

収量 5.28 g (95%). mp 56–58 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 47.8^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$ , 0.60. EIMS m/z : 532 ( $M^+$ ), 501 ( $M^+ - OCH_3$ ), 416 (501 – Aib), 331 (416 – Aib), 232 (331 – Val). Anal. Calcd for  $C_{27}H_{40}N_4O_7$ : C, 60.89; H, 7.57; N, 10.52. Found: C, 60.58; H, 7.88; N, 10.52.

#### **Z-Pro-Val-Aib-Aib-OH**

上記保護 tetrapeptide [2] (1.32 g, 2.48 mmol) を、MeOH (10 ml) に溶かし C 法に従ってアルカリ加水分解した。

収量 0.98 g (99%). mp 108–112 °C.  $R_f$ , 0.36.

#### **Z-Leu-Aib-OMe**

Z-Leu-OH (6.46 g, 24.4 mmol)、HOBt (3.29 g, 1 当量)、DCC (5.02 g, 1 当量) を順次、TEA (3.41 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Aib-OMe (3.74 g, 1 当量) の DMF (30 ml) 溶液に加え 40 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH=95 : 5) に付した。

収量 7.28 g (82%). mp 71–72 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 22.4^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$ , 0.76. EIMS m/z : 364 ( $M^+$ ). Anal. Calcd for  $C_{19}H_{28}N_2O_5$ : C, 62.62; H, 7.74; N, 7.69. Found: C, 62.51; H, 7.47; N, 7.78.

#### **HCl·H-Leu-Aib-OMe**

Z-Leu-Aib-OMe (6.00 g, 16.5 mol) を、90% aq. MeOH (15 ml) に溶かし D 法に従って接触還元した。触媒を濾去し 1N HCl (17 ml) を加え濃縮し塩酸塩とした。

収量 4.07 g (95%).  $R_f$ , 0.48.

#### **Z-Gly-Leu-Aib-OMe**

Z-Gly-OH (3.78 g, 18.1 mmol)、HOBt (2.44 g, 1 当量)、DCC (3.73 g, 1 当量) を順次、TEA (2.53 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Leu-Aib-OMe (4.82 g, 1 当量) の DMF (20 ml) 溶液に加え 40 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣は EtOAc – n-hexane から再結晶した。

収量 5.94 g (78%). mp 149–151 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 34.2^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$ , 0.45. EIMS m/z : 421 ( $M^+$ ), 390 ( $M^+ - OCH_3$ ), 277 (390 – Aib – CO). Anal. Calcd for  $C_{21}H_{31}N_3O_6$ : C, 59.84; H, 7.41; N, 9.97. Found: C, 59.83; H, 7.41; N, 10.15.

#### **Z-Gly-Leu-Aib-OH**

Z-Gly-Leu-Aib-OMe (3.00 g, 7.12 mmol) を、MeOH (20 ml) に溶かし C 法に従ってアルカリ加水分解した。残渣は EtOAc – n-hexane より再結晶した。

収量 1.97 g (68%). mp 152–154 °C.  $R_f$ , 0.56.

#### **Z-Gly-Leu-Aib-OPac [3]**

Z-Gly-Leu-Aib-OH (1.25 g, 3.07 mmol) と phenacyl bromide (0.61 g, 1 当量) の DMF (6 ml) 溶

液に TEA (0.43 ml, 1 当量) を加え 24 時間攪拌した。反応液を濃縮、残渣を EtOAc で抽出した。EtOAc 層を 5% NaHCO<sub>3</sub>、飽和食塩水で順次洗浄、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥し濃縮した。残渣はシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 98 : 2) を用いて精製した。

収量 1.37 g (82%). mp 53–55 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 30.9^\circ$  (C=1.0, MeOH). *R<sub>f</sub>* 0.52. positive FABMS *m/z*: 526 (MH<sup>+</sup>), 390 (MH<sup>+</sup> – OPac – H), 305 (390 – Aib), 222 (MH<sup>+</sup> – [Z – Gly – Leu] + H), 335 (MH<sup>+</sup> – [Z – Gly] + H), 392 (MH<sup>+</sup> – Z + H). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·1/4 H<sub>2</sub>O: C, 63.44; H, 6.75; N, 7.93. Found: C, 63.47; H, 6.70; N, 7.85.

#### **HBr · H-Gly-Leu-Aib-OPac**

Z-Gly-Leu-Aib-OPac [3] (1.20 g, 2.28 mmol) の AcOH (5 ml) 溶液に 30% HBr /AcOH (10 ml) を加え 2 時間攪拌した。無水エーテルを加え、生じた沈殿物を集め、無水エーテルで洗浄、KOH 上で乾燥した。

収量 1.02 g (95%). *R<sub>f</sub>* 0.24.

#### **Z-Ile-Aib-OMe**

Z-Ile-OH (5.00 g, 18.9 mmol)、HOBT (2.55 g, 1 当量)、DCC (3.89 g, 1 当量) を順次、TEA (2.74 ml, 1 当量) を含む HCl · H-Aib-OMe (2.89 g, 1 当量) の DMF (20 ml) 溶液に加え 40 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 95 : 5) に付した。

収量 3.74 g (54%). mp 82.5–85 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 24.0^\circ$  (C=1.0, MeOH). *R<sub>f</sub>* 0.63. EIMS *m/z*: 364 (M<sup>+</sup>), 333 (M<sup>+</sup> – OCH<sub>3</sub>), 248 (333 – Aib), 220 (248 – CO). Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 62.62; H, 7.74; N, 7.69. Found: C, 62.63; H, 7.82; N, 7.69.

#### **HCl · H-Ile-Aib-OMe**

Z-Ile-Aib-OMe (3.00 g, 8.23 mmol) を、90% aq. MeOH (20 ml) に溶かし D 法に従って接触還元した。触媒を濾去、1N HCl (10 ml) を加え濃縮し塩酸塩とした。

収量 2.10 g (95%). *R<sub>f</sub>* 0.39.

**Z-Gln-Aib-OMe** Z-Gln-OH (5.48 g, 19.6 mmol)、HOBT (2.64 g, 1 当量)、DCC (4.03 g, 1 当量) を順次、TEA (2.74 ml, 1 当量) を含む HCl · H-Aib-OMe (3.00 g, 1 当量) の DMF (20 ml) 溶液に加え 44 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣は EtOH より再結晶した。

収量 5.27 g (71%). mp 134–136 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 15.8^\circ$  (C=1.0, MeOH). *R<sub>f</sub>* 0.57. EIMS *m/z*: 379 (M<sup>+</sup>), 348 (M<sup>+</sup> – OCH<sub>3</sub>), 320 (348 – CO), 263 (348 – Aib), 235 (268 – CO). Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: C, 56.98; H, 6.64; N, 11.08. Found: C, 57.13; H, 6.78; N, 10.99.

#### **Z-Gln-Aib-OH**

Z-Gln-Aib-OMe (2.61 g, 6.88 mmol) を、MeOH (20 ml) に溶かし C 法に従ってアルカリ加水分解した。



収量 2.16 g (86%). mp 141–144 °C.  $R_f$ , 0.18.

#### **Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OMe [4]**

Z-Gln-Aib-OH (1.39 g, 3.80 mmol)、HOBt (513 mg, 1 当量)、DCC (784 mg, 1 当量) を順次、TEA (0.53 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Ile-Aib-OMe (1.02 g, 1 当量) の DMF (100 ml) 溶液に加え 40 時間攪拌した。DCU を濾去、濾液を濃縮後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 9:1) 付した。

収量 1.82 g (82%). mp 83.5–85.5 °C.  $[\alpha]_D^{26} - 17.6^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$ , 0.39. EIMS m/z: 577 (M<sup>+</sup>), 546 (M<sup>+</sup> – OCH<sub>3</sub>), 461 (546 – Aib), 433 (461 – CO), 348 (461 – Ile), 320 (348 – CO), 263 (348 – Aib). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>·1/2 H<sub>2</sub>O: C, 57.32; H, 7.56; N, 11.94. Found: C, 57.02; H, 7.50; N, 11.91.

#### **Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OH**

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OMe [4] (1.01 g, 1.75 mmol) を、MeOH (10 ml) に溶かし C 法に従ってアルカリ加水分解した。

収量 0.78 g (79%). mp. 102–104 °C.  $R_f$ , 0.49.

#### **Z-Ala-Aib-Aib-OMe**

Z-Ala-OH (2.72 g, 12.2 mmol)、HOBt (1.65 g, 1 当量)、DCC (2.51 g, 1 当量) を順次、TEA (1.71 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Aib-Aib-OMe (2.91 g, 1 当量) の DMF (30 ml) 溶液に加え 40 時間攪拌した。A 法に従って精製し残渣は EtOAc より再結晶した。

収量 4.05 g (82%). mp 125–126 °C.  $[\alpha]_D^{26} - 7.0^\circ$  (C = 2.27, MeOH).  $R_f$ , 0.63. EIMS m/z: 376 (M<sup>+</sup> – OCH<sub>3</sub>), 263 (376 – Aib – CO). Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: C, 58.95; H, 7.17; N, 10.31. Found: C, 58.99; H, 7.36; N, 10.18.

#### **H-Ala-Aib-Aib-OMe**

Z-Ala-Aib-Aib-OMe (5.87 g, 14.4 mmol) を、数滴の AcOH を含む MeOH (40 ml) に溶かし D 法に従って接触還元した。

収量 3.74 g (95%).  $R_f$ , 0.39.

#### **Z-Ala-Ala-OMe**

Z-Ala-OH (11.48 g, 51.4 mmol)、DCC (10.61 g, 1 当量) を順次、TEA (7.20 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Ala-OMe (7.18 g, 1 当量) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml) 溶液に加え 40 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣は EtOAc – n-hexane より再結晶した。

収量 11.78 g (74%). mp 109–112 °C.  $[\alpha]_D^{26} - 46.0^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$ , 0.75. EIMS m/z: 308 (M<sup>+</sup>), 277 (M<sup>+</sup> – OCH<sub>3</sub>), 206 (277 – Aib). Anal. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 58.43; H, 6.54; N, 9.09. Found: C, 58.54; H, 6.56; N, 9.38.

#### **Z-Ala-Ala-OH**

Z-Ala-Ala-OMe (11.78 g, 38.2 mmol) を、反応温度を 5℃以下に保ち C 法に従ってアルカリ加水分解した。残渣は、EtOAc - n-hexane より再結晶した。

収量 7.82 g (70%). mp 149-151

℃.  $R_f$  0.23.

#### **Z-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-OMe**

Z-Ala-Ala-OH (2.58 g, 8.77 mmol)、HOBt (1.18 g, 1 当量)、DCC (1.81 g, 1 当量) を順次、H-Ala-Aib-Aib-OMe (2.40 g, 1 当量) の DMF (30 ml) 溶液に加え 48 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣は EtOAc - エーテルより再沈殿した。

収量 3.56 g (74%). mp 196-198℃.  $[\alpha]_D^{25} - 34.0^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$  0.24. EIMS m/z : 549 ( $M^+$ ), 518 ( $M^+ - OCH_3$ ), 433 (518 - Aib), 406 (433 - CO), 348 (433 - Aib), 277 (348 - Ala), 206 (277 - Ala). Anal. Calcd for  $C_{26}H_{39}N_5O_8$ : C, 56.82; H, 7.15; N, 12.74. Found: C, 56.92; H, 7.22; N, 12.57.

#### **HCl·H-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-OMe**

Z-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-OMe (1.43 g, 2.60 mmol) を、数滴の AcOH を含む MeOH (15 ml) に溶かし D 法に従って接触還元した。触媒を濾去、1N HCl (2.6 ml) を加え濃縮し塩酸塩とした。

収量 1.14g (97%).  $R_f$  0.29.

#### **Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-OMe [5]**

Ac-Aib-OH (373 mg, 2.57 mmol)、HOBt (347 mg, 1 当量)、DCC (529 mg, 1 当量) を順次、TEA (0.36 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-OMe (1.16 g, 1 当量) の DMF (10 ml) 溶液に加え 48 時間攪拌した。DCU と溶媒を取り除き、残渣を EtOAc で抽出した。水層を順次、Amberlite IR-120 と IRA-400 で処理し、濃縮した。残渣は MeOH - エーテルより再結晶した。

収量 1.07 g (77%). mp 108-111℃.  $[\alpha]_D^{25} - 3.4^\circ$  (C=0.9, MeOH).  $R_f$  0.35. positive FABMS m/z : 543 ( $MH^+$ ), 511 ( $MH^+ - OCH_3 - H$ ), 426 (511 - Aib), 341 (426 - Aib), 270 (341 - Ala), 199 (270 - Ala), 128 (199 - Ala). Anal. Calcd for  $C_{24}H_{42}N_6O_8 \cdot 3/2 H_2O$ : C, 50.60; H, 7.96; N, 14.75. Found: C, 50.57; H, 7.77; N, 14.71.

#### **Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-OH**

上記保護 hexapeptide [5] (0.55 g, 1.01 mmol) をアルカリ加水分解し、反応液を Amberlite IR-120 で中和、濃縮した。

収量 0.51g (95%). mp 125-128℃.  $R_f$  0.21.

#### **Z-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [Positions 14-20]**

Z-Pro-Val-Aib-Aib-OH (717 mg, 1.38 mmol)、HOBt (187 mg, 1 当量)、DCC (285 mg, 1 当

量)を順次、H-Gln-Gln-Pheol (563 mg, 1 当量)のDMF (5 ml)に加え48時間攪拌した。B法に従って精製し、残渣はMeOH-エーテルより再沈殿した。

収量 657 mg (52%). mp 110–113 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 33.9^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$ , 0.20. positive FABMS m/z : 908 (MH<sup>+</sup>), 629 (MH<sup>+</sup> - Pheol - Gln - H), 501 (629 - Gln), 416 (501 - Aib), 331 (416 - Aib), 232 (331 - Val). Anal. Calcd for C<sub>45</sub>H<sub>65</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>•H<sub>2</sub>O: C, 58.36; H, 7.29; N, 13.61. Found: C, 58.68; H, 7.27; N, 13.51.

#### **H-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol**

Z-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (1.25 g, 1.38 mmol)を、MeOH (15 ml)に溶かしD法に従って接触還元した。

収量 0.96 g (90%).  $R_f$ , 0.33.

#### **Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-OPac [Positions 7–13]**

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OH (600 mg, 1.06 mmol), HOBT (144 mg, 1 当量)、DCC (219 mg, 1 当量)を順次、TEA (148  $\mu$ l, 1 当量)を含むHBr•H-Gly-Leu-Aib-OPac (500 mg, 1 当量)のDMF (7 ml)溶液に加え48時間攪拌した。A法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィ- (CHCl<sub>3</sub>: MeOH=9:1)に付した。

収量 519 mg (52%). mp 103–106 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 7.8^\circ$  (C=1.0, MeOH).  $R_f$ , 0.51. positive FABMS m/z : 937 (MH<sup>+</sup>), 801 (MH<sup>+</sup> - OPac - H), 716 (801 - Aib), 603 (716 - Leu), 546 (603 - Gly), 461 (546 - Aib), 348 (461 - Ile), 263 (348 - Aib), 803 (MH<sup>+</sup> - Z + H). Anal. Calcd for C<sub>47</sub>H<sub>68</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>•H<sub>2</sub>O: C, 59.10; H, 7.39; N, 11.73. Found: C, 59.30; H, 7.48; N, 11.78.

#### **Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-OH**

上記保護 heptapeptide (positions 7–13) (328 mg, 0.35 mmol)の90% AcOH (10 ml)溶液に、Zn末 (1.03 g)を加え、0°Cで1時間、室温で2時間攪拌した。Zn末を濾去、濾液を濃縮後、残渣を5% citric acidに溶かしEtOAcで抽出した。EtOAc層を飽和食塩水で洗浄、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ濃縮した。

収量 241 mg (84%). mp 123–126 °C.  $R_f$ , 0.38.

#### **Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [Positions 7–20]**

上記 heptapeptide acid (positions 7–13) (295 mg, 0.36 mmol)、HOBT (48.6 mg, 1 当量)、DCC (74 mg, 1 当量)を順次、脱保護 heptapeptide (positions 14–20) (278 mg, 1 当量)のDMF (5 ml)に加え72時間攪拌した。B法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィ- (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH=8:2)に付した。

収量 255mg (45%). mp 152–154 °C.  $[\alpha]_D^{25} - 14.9^\circ$  (C=0.4, MeOH).  $R_f$ , 0.50. positive FABMS m/z : 1574 (MH<sup>+</sup>), 1295 (MH<sup>+</sup> - Pheol - Gln - H), 1167 (1295 - Gln), 1082 (1167 - Aib), 997

(1082 – Aib), 898 (997 – Val), 801 (898 – Pro), 716 (801 – Aib), 603 (716 – Leu), 546 (603 – Gly), 461 (546 – Aib), 348 (461 – Ile), 263 (348 – Aib). Anal. Calcd for  $C_{76}H_{119}N_{17}O_{19} \cdot H_2O$ : C, 56.67; H, 7.70; N, 14.78. Found: C, 56.42; H, 7.71; N, 14.81.

**H–Gln–Aib–Ile–Aib–Gly–Leu–Aib–Pro–Val–Aib–Aib–Gln–Gln–Pheol**

上記 tetradecapeptide (124 mg, 78.70  $\mu$  mol) を、MeOH (4 ml) に溶かし D 法に従って接触還元した。

収量 108 mg (96 %).  $R_f$  0.74.

**Ac–Aib–Ala–Ala–Ala–Aib–Aib–Gln–Aib–Ile–Aib–Gly–Leu–Aib–Pro–Val–Aib–Aib–Gln–Gln–Pheol [trichosporin B–V]**

[5] から誘導した Ac–Aib–Ala–Ala–Ala–Aib–Aib–OH (37.3 mg, 2 当量)、HOBt (9.5 mg, 2 当量)、DCC (14.6 mg, 2 当量) を順次、上記アミン成分 (positions 7–20) (51 mg, 35.3  $\mu$  mol) の DMF (5 ml) に加え 48 時間攪拌した。B 法に従って精製し、残渣 (62.5 mg) は分取 HPLC に付した。[分取条件: mobile phase, MeOH–H<sub>2</sub>O (85 : 15, v/v); flow rate, 5 ml/min; detector, UV (220 nm); column, YMC S–5 120A ODS (20 mm i. d.  $\times$  250 mm); column temperature, 40 °C].

収量 23.3 mg (34%). mp 267–270 °C.  $[\alpha]_D^{26} - 17.7^\circ$  (C = 0.3, MeOH).  $R_f$  0.31. positive FABMS: Fig. 41 を参照. Amino acid ratios (6N HCl, 24 h): Glu 3.33 (3), Ala 2.88 (3), Val 1.00 (1), Gly 1.00 (1), Ile 0.94 (1), Leu 0.98 (1) and Pro 0.91 (1).

## 第7章に関する実験

### ラット肝ミトコンドリア

ラット肝ミトコンドリアは、D. K. Mayerらの方法<sup>49)</sup>で単離し、ビュウレット法を用いて単離されたミトコンドリア中の蛋白の定量を行った。

### 脱共役活性

脱共役活性は、反応液にロテノン、ミトコンドリア、試料を順次添加し、酸素電極を用いて測定した。<sup>50)</sup>

### 牛副腎髄質細胞

牛副腎をコラゲナーゼで処理し、副腎髄質細胞を単離した。単離細胞は、直ちに牛血清と抗生物質を含むイーグルの最少必須培地に懸濁し培養皿に移した( $2 \times 10^6$  cells/dish)。細胞は、COインキュベーター中37で4日間培養した。 $2 \times 10^6$ 個の細胞あたりカテコールアミンは、アドレナリン、ノルアドレナリンとして $30 \pm 2.4 \mu\text{g}$ 含まれる。

### カテコールアミン分泌と $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の流入

培養細胞は、KRH (Krebs-Ringer-HEPES\*) buffer\*\* (pH7.4) で洗浄、KRH buffer中で10分間37でプレインキュベーションした後、TS-B類の存在あるいは非存在下において、また、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の存在あるいは非存在下においてインキュベーションした。分泌されたカテコールアミンは、反応液を氷水に注ぎ、0.4 N 過塩素酸で抽出した。それをAl(OH)に吸着させ、ethylenediamine condensation法<sup>51)</sup>により定量した。

細胞内に流入した $^{45}\text{Ca}^{2+}$ は、インキュベーションした細胞を $\text{Ca}^{2+}$ を含まないKRH bufferで洗浄し10%Triton X-100中で破壊、可溶化した後、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより定量した。

### 乳酸脱水酵素(LDH)の活性<sup>52)</sup>

培養細胞を、10分間TS-B類あるいはジギトニンとともにインキュベーションした。細胞はKRH bufferで洗浄し2% Triton X-100中で破壊可溶化し、洗浄液は反応液と合わせた。Pesceらの方法を用いて、細胞外に放出されたLDHならびに細胞内LDHの活性を測定した。

---

\* 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

\*\* 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25 mM HEPES, 5.6 mM グルコースと5%牛血清アルブミンからなる。

## 引用文献

1. a) C. E. Meyer and F. Reusser, *Experientia*, **23**, 85 (1967).  
b) K. Fuji, E. Fujita, Y. Takaishi, T. Fujita, I. Arita, M. Komatsu and N. Hiratsuka, *Experientia*, **34**, 237 (1978).
2. a) Y. Takaishi, H. Terada and T. Fujita, *Experientia*, **36**, 550 (1980).  
b) M. K. Mathew, R. Nagaraj and P. Balaram, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 548 (1981).  
c) M. K. Das, S. Raghothama and P. Balaram, *Biochemistry*, **25**, 7110 (1986).
3. G. Irmscher and G. Jung, *Eur. J. Biochem.*, **80**, 165 (1977).
4. a) P. Mueller and D. O. Rudin, *Nature*, **217**, 713 (1968).  
b) A. L. Y. Lau and S. I. Chan, *Biochemistry*, **15**, 2551 (1976).  
c) W. Hanke, C. Methfessel, H. Wilmsen, E. Katz, G. Jung and G. Boheim, *Biochim. Biophys. Acta*, **727**, 108 (1983).  
d) U. Banerjee, R. Zidovetzki, R. R. Birge and S. Chan, *Biochemistry*, **24**, 7621 (1985).
5. *Eur. J. Biochem.*, **138**, 5 (1984); *ibid*, **138**, 9 (1984).
6. a) R. C. Pandey, J. C. Cook, Jr., and K. L. Reinhart, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8469 (1977).  
b) B. F. Gisin, D. G. Davis, Z. K. Borowska, J. E. Hall and S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6373 (1981).
7. T. Fujita, Y. Takaishi, E. Fujita, K. Fuji, N. Hiratsuka, M. Komatsu and I. Arita *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 585 (1981).
8. a) G. Jung, W. A. König, D. Leibfritz, T. Ooka, K. Janko and G. Boheim, *Biochim. Biophys. Acta*, **433**, 164 (1976).  
b) E. Katz, M. Aydin, N. Lucht, W. A. König, T. Ooka and G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.*, 1041 (1985).  
(1978).
9. H. Brückner, *J. Chromatogr.*, **296**, 263 (1984).
10. a) H. Brückner, W. A. König, M. Greiner and G. Jung, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **18**, 476 (1979).  
b) G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim and G. Jung, *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 470 (1978).

11. a) B. Bodo, S. Rebuffat, M. E. Hajji and D. Davoust, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6011 (1985).  
 b) M. E. Hajji, S. Rebuffat, P. Hennig, D. Davoust and B. Bodo, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **29**, 207 (1987).  
 c) S. Rebuffat, M. E. Hajji, D. Lecommandeur and B. Bodo, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **34**, 200 (1989).
12. a) T. Fujita, Y. Takaishi, H. Moritoki, T. Ogawa and K. Tokimoto, *Chem Pharm. Bull.*, **32**, 1822 (1984).  
 b) T. Fujita, Y. Takaishi, K. Matsuura, Y. Takeda, Y. Yoshioka and H. Brückner, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2870 (1984).  
 c) T. Fujita, A. Iida, O. Shima, Y. Takaishi, Y. Takeda, presented at the meeting on Peptides Forming Voltage Dependent Channels, Paris (1988), p. 9.
13. a) R. C. Pandey, H. Meng, J. C. Cook, Jr., and K. L. Reinhart, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5203 (1977).  
 b) R. C. Pandey, J. C. Cook, Jr., and K. L. Reinhart, Jr., *J. Antibiot.*, **31**, 241
14. a) R. C. Pandey, J. C. Cook, Jr., and K. L. Reinhart, Jr., *ibid.*, **99**, 5205 (1977).  
 b) K. L. Reinhart, Jr., L. A. Gaudioso, M. L. Moore, R. C. Pandey, J. C. Cook, Jr., M. Barber, R. D. Sedgwick, R. S. Bordoli, A. N. Tyler and B. N. Green, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6517 (1981).
15. a) A. Isogai, A. Suzuki, S. Higashikawa, S. Komiya and S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 3029 and 3033 (1980).  
 b) M. Sato, T. Beppu and K. Arima, *ibid.*, **44**, 3037 (1980).  
 c) Y. Mori, M. Tsuda, M. Suzuki, K. Fukushima and T. Arai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 94 (1982).
16. J. W. Payne, R. Jakes and B. S. Hartley, *Biochem. J.*, **117**, 757 (1970).
17. a) U. P. Fringeli and M. Fringeli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3852 (1979).  
 b) M. K. Methew, R. Nagaraj and P. Balaram, *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 336 (1981).  
 c) J. E. Hall and M. D. Cahalan, *J. Gen. Physiol.*, **79**, 387 (1982).  
 d) M. D. Cahalan and J. Hall, *J. Gen. Physiol.*, **79**, 411 (1982).  
 e) M. K. Methew, R. Nagaraj and P. Balaram, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2170 (1982).  
 f) T. L. Doan, M. E. Hajji, S. Rebuffat, M. R. Rajesvari and B. Bodo, *Biochim. Biophys. Acta*, **858**, 1 (1986).

- g) G. Scharz, S. Stankowski and V. Rizzo, *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 141 (1986).
- h) K. P. Voges, G. Jung and W. Sawyer, *Biochim. Biophys. Acta*, **896**, 64 (1987).
- i) V. Rizzo, S. Stankowski and G. Scharz, *Biochemistry*, **26**, 2751 (1987).
- j) H. Vogel, *Biochemistry*, **26**, 4562 (1987).
- k) M. E. Hajji, S. Rebuffat, T. L. Doan, G. Klein, M. Satre and B. Bodo, *Biochim. Biophys. Acta*, **978**, 97 (1989).
18. T. Fujita, Y. Takaishi, Y. Takeda, T. Fujiyama and T. Nishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4419 (1984).
19. a) G. Jung and N. Dubischar, *Eur. J. Biochem.*, **54**, 395 (1975).  
 b) P. K. Sarkar and P. Doty, *Biochemistry*, **55**, 981 (1966).  
 c) N. Greenfield and G. D. Fasman, *Biochemistry*, **8**, 4108 (1969).
20. a) K. Nagayama, A. Kumar, K. Wüthrich and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **40**, 321 (1980).  
 b) A. Bax and R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, **44**, 542 (1981).
21. a) H. Brückner and G. Jung, *Chromatographia*, **13**, 170 (1980).  
 b) H. Brückner and G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.*, 1677 (1982).
22. D. F. Hunt, J. Shabanowitz, R. T. McIver, Jr. and J. E. P. Syka, *Anal. Chem.*, **57**, 768 (1985).
23. D. F. Hunt, J. R. Yates III, J. Shabanowitz, S. Winston and C. R. Hauser, *Proc. Natl. Sci. USA*, **83**, 6233 (1986).
24. a) R. S. Johnson and K. Biemann, *Biochemistry*, **26**, 1209 (1987).  
 b) T. Nakamura, H. Nagaki, Y. Ohki and T. Kinishita, *Anal. Chem.*, **62**, 311 (1990).
25. M. A. Khaled and D. W. Urry, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 230 (1981).
26. a) A. Kumar, G. Wagner and R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3654 (1981).  
 b) S. Macura, K. Wüthrich and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **47**, 351 (1982).
27. a) A. Bax and M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093 (1986).  
 b) M. F. Summers, L. G. Marzilli and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 4285 (1986).
28. a) H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock and H. R. Loosli, *J. Magn. Reson.*, **57**, 331 (1984).  
 b) H. Kessler, C. Griesinger and J. Lautz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **23**, 444



- (1984).
- c) H. Kessler, W. Bermel and C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1083 (1985).
29. a) G. Eich, G. Bodenhausen and R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3731 (1982).
- b) A. Bax and G. Drobny, *J. Magn. Reson.*, **61**, 306 (1985).
30. A. Bax and D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, **65**, 355 (1985).
31. G. Wider, K. H. Lee and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **155**, 367 (1982).
32. G. Wagner and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **155**, 347 (1982).
33. R. Bazzo, M. J. Tappin, A. Pastore, T. S. Harvey, J. A. Carver and I. D. Campbell, *Eur. J. Biochem.*, **173**, 139 (1988).
34. I. L. Karle, J. L. Flippen-Anderson, K. Uma, H. Balaram and P. Balaram, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 765 (1989).
35. R. Nagaraj and P. Balaram, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1041 (1979).
36. M. Iqbal and P. Balaram, *Biopolymers*, **21**, 1427 (1982).
37. J. Lauterwein, L. R. Brown and K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta*, **622**, 219 (1980).
38. A. Pardi and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **180**, 741 (1984).
39. K. Wüthrich, M. Billeter and W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **180**, 715 (1984).
40. a) U. Banerjee, F. P. Tsui, T. N. Balasubramanian, G. R. Marshall and S. I. Chan, *J. Mol. Biol.*, **165**, 757 (1983).
- b) G. Esposito, J. A. Carver, J. Boyd and I. D. Campbell, *Biochemistry*, **26**, 1043 (1987).
- c) H. Schmitt, W. Winter, R. Bosch and G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.*, 1304 (1982).
- d) M. Iqbal and P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5548 (1981).
- e) A. K. Francis, M. Iqbal, P. Balaram and M. Vijayan, *FEBS Letters*, **155**, 230 (1983).
- f) T. Butters, P. Hütter, G. Jung, N. Pauls, H. Schmitt, G. M. Sheldrick, and W. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 889 (1981).
- g) G. Jung, R. Bosch, E. Katz, H. Schmitt, K. P. Voges and W. Winter, *Biopolymers*, **22**, 241 (1983).
- h) R. Bosch, G. Jung, H. Schmitt, G. M. Sheldrick and W. Winter, *Angew.*

- Chem. Int. Ed. Engl.*, **23**, 450 (1984).
41. D. C. Davis and B. F. Gisin, *FEBS Letters*, **133**, 247 (1981).
  42. R. O. Fox. Jr. and F. M. Richards, *Nature*, **300**, 325 (1982).
  43. a) H. Schmitt and G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.*, 321 (1985).  
 b) T. M. Balasubramanian, N. C. E. Kendrick, M. Taylor, G. R. Marshall, J. E. Hall, I. Vodyanoy and F. Reusser, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6127 (1981).
  44. a) W. A. Thomas and M. K. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 994 (1972).  
 b) D. E. Dorman and F. A. Bovey, *J. Org. Chem.*, **38**, 2379 (1973).
  45. S. S. Wang, B. F. Gisin, D. P. Winter, R. Makofske, D. Kulesha, C. Tzougraki and J. Meienhofer, *J. Org. Chem.*, **42**, 1286 (1977).
  46. N. Oi and H. Kithara, *J. Chromatogr.*, **285** 198 (1984).
  47. H. Seki, K. Koga, H. Matsuo, S. Ohki, I. Matsuo and S. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 995 (1965).
  48. J. Beacham, G. Dupuis, F. M. Finn, H. T. Storey, C. Yanaihara, N. Yanaihara and K. Hofmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5526 (1971).
  49. a) H. Terada, *Biochim. Biophys. Acta*, **639**, 225 (1981).  
 b) 寺田弘, 生化学, 第51卷, 211 (1979).
  50. D. K. Mayers and E. C. Slater, *Biochem. J.*, **67**, 558 (1957).
  51. H. W. Malherbe and A. D. Bone, *Biochem. J.*, **51**, 311 (1952).
  52. A. Pesce, R. H. Mckay, F. Stolzenbach, R. D. Cahn and N. Kaplan, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1753 (1964).